

Funktionelle Analyse von Proteasom-Subtypen aus Leber von Ratten verschiedener Altersstufen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biochemikerin Sabrina Gohlke

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan.Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Stefan Hecht

Gutachter:

1. Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel
2. Prof. Dr. Thomas Sommer
3. Prof. Dr. Wolfgang Dubiel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.05.2013

"We cannot change the cards we are dealt, just how we play the hand."

- Randy Pausch -

ZUSAMMENFASSUNG	- 6 -
1. EINLEITUNG.....	- 8 -
1.1 Das Ubiquitin-Proteasom System.....	- 8 -
1.1.1 Das 20S Proteasom	- 8 -
1.1.2 Der Proteasom-Regulator PA700 (19S)	- 10 -
1.1.3 Der Proteasom-Aktivator PA28	- 11 -
1.1.4 Assemblierung von 20S Proteasomen	- 12 -
1.1.5 Inkorporation von Immununtereinheiten.....	- 12 -
1.1.6 Subpopulationen und Subtypen des 20S Proteasoms	- 13 -
1.2 Das Proteasom-System und die zelluläre Immunantwort.....	- 15 -
1.2.1 Die Antigenpräsentation.....	- 15 -
1.2.2 Peptid-Spleißen durch verschiedene Proteasom-Typen	- 16 -
1.3 Das Proteasom-System der Leber	- 18 -
1.3.1 Aufbau und Funktion der Leber	- 19 -
1.3.2 Veränderung der Leber im Alter	- 20 -
1.3.3 Proteasom-Populationen der Leber	- 21 -
1.4 Zielsetzung.....	- 22 -
2. MATERIAL UND METHODEN	- 24 -
2.1 Material.....	- 24 -
2.1.1 Geräte	- 24 -
2.1.2 Reagenzien	- 25 -
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	- 26 -
2.1.4 Säulen und Chromatographiematerialien	- 27 -
2.1.5 Antikörper	- 28 -
2.1.6 Polypeptide	- 28 -
2.2 Methoden	- 28 -
2.2.1 Biochemische Methoden	- 28 -
2.2.1.1 Präparation von 20S Proteasomen aus Leber (nach Schmidt, 2006) ...	- 29 -
2.2.1.2 Präparation von PA28 aus Erythrocyten (nach Kuehn und Dahlmann, 1996)	- 30 -
2.2.1.3 Isolation von 20S Proteasom-Subtypen (nach Dahlmann, 2000)	- 31 -
2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung des 20S Proteasoms mittels Bradford	- 31 -
2.2.1.5 Fluorogene Bestimmung der Aktivitäten des 20S Proteasoms	- 31 -
2.2.1.6 Präzipitation von Protein	- 32 -
2.2.1.7 Rocket Elektrophorese (nach Weeke, 1973).....	- 32 -
2.2.1.8 SDS Polyacrylamid Elektrophorese (nach Laemmli, 1970)	- 33 -
2.2.1.9 Western Blot Analyse	- 33 -
2.2.1.10 1D-Elektrophorese unter nativen Bedingungen.....	- 34 -
2.2.1.11 Nativ-Western Blot	- 35 -
2.2.1.12 2D Elektrophorese (nach O'Farrel, 1975)	- 35 -
2.2.1.13 Proteolytische Prozessierung von synthetischen Peptiden in vitro	- 36 -
2.2.1.14 Massenspektrometrischen Analyse von Prozessierungsprodukten.....	- 37 -
2.2.1.15 Proteinidentifizierung	- 37 -
2.2.2 Zellbiologische Methoden.....	- 38 -
2.2.2.1 Kultivierung von Hepatocysten.....	- 38 -

2.2.2.2 Isolierung von 20S Proteasomen aus HuH-7	- 38 -
2.2.3 Analytische Methoden	- 39 -
2.2.3.1 Statistische Analysen	- 39 -
2.2.3.2 Ermittlung von Intensitäten in Gelen mittels Pixelzahlen	- 39 -
2.2.3.3 Quantifizierung von Spalt-Peptiden im Verdau mit 20S Proteasom	- 39 -
2.2.3.4 Ermittlung von Mengen gebildeter Peptidfragmente und Ermittlung von Schnitthäufigkeiten der 20S Proteasomen	- 40 -
3. ERGEBNISSE.....	- 41 -
3.1 Untersuchung von Rohextrakten aus Rattenleber verschiedener Altersstufen.....	- 41 -
3.1.1 Proteingehalt und proteolytische Aktivität.....	- 41 -
3.1.2 Aktivitätsbestimmung der Proteasom-Komplexe in Lysaten durch Substrat-Overlay	- 43 -
3.1.3 Bestimmung der Summe des Gesamt-20S-Proteasom-Gehalts in Rohextrakten	- 44 -
3.1.4 Quantifizierung der proteasomalen Standard- und Immununtereinheiten in Leberextrakten	- 45 -
3.2 Reinigung von 20S Proteasomen aus Rattenleber verschiedener Altersstufen.....	- 47 -
3.2.1 Trennung von Subpopulationen	- 47 -
3.2.2 Menge und Aktivität der Proteasom-Subpopulationen aus Leber von Ratten verschiedener Altersstufen	- 48 -
3.2.3 Untereinheiten-Analyse der Proteasom-Subpopulationen aus Leber von Ratten verschiedener Altersstufen.....	- 51 -
3.2.4 Vergleichender Polypeptidabbau zur Analyse der proteolytischen Aktivitäten der Subpopulationen aus Ratten verschiedener Altersstufen	- 56 -
3.3 Trennung der 20S Proteasom-Subpopulationen in ihre Proteasom-Subtypen.....	- 60 -
3.3.1 Vergleich von Proteasom-Subtypenspektren aus Leber von Ratten verschiedener Altersstufen	- 60 -
3.3.2 Vergleich der Aktivitäten der isolierten Subtypen aus Leber von Ratten verschiedener Altersstufen.....	- 62 -
3.3.3 Analyse der Untereinheitenzusammensetzung der Proteasom-Subtypen.....	- 65 -
3.4 Altersabhängige Veränderungen der Proteasom-Subtypen hinsichtlich ihrer Peptid-Prozessierung, ihrer Schnittpräferenzen und Peptid-Spleiß Aktivität	- 68 -
3.4.1 Vergleich der proteolytischen Prozessierung von Peptidsubstraten durch Subtypen 2 Mo alter Ratten.....	- 68 -
3.4.2 Unterschiedliche Schnittpräferenzen in Subtypen der 2 Monate alten Ratten	- 69 -
3.4.3 Altersabhängige Veränderung der Schnittpräferenzen in Subtypen.....	- 72 -
3.4.4 Protein-Spleißen durch 20S Proteasom-Subtypen bzw. Subpopulationen	- 76 -
3.5 Reinigung von 20S Proteasomen aus Humanleberzellen sowie aus Humanleber	- 79 -
3.5.1 Trennung von Proteasom-Subpopulationen und Subtypen aus Humanleber im Vergleich mit humanen Hepatocyten.....	- 80 -
3.5.2 Untereinheiten-Analyse von humanen 20S Subpopulationen mittels 2D – und 1D Gelelektrophorese	- 82 -
3.5.3 Trennung von 20S Proteasom-Subpopulationen aus Humanleber und Hepatocyten in Subtypen	- 83 -
3.5.4 Peptidverdau mit humanen 20S Proteasom-Subtypen	- 84 -

4. DISKUSSION	- 86 -
4.1 Analyse von Proteasom-Populationen	- 88 -
4.1.1 Untersuchung von Proteasomen in Leber-Extrakten von Ratten im Vergleich zu gereinigten 20S Proteasom-Subpopulationen	- 88 -
4.1.2 <i>In vitro</i> -Prozessierung von Polypeptidsubstraten durch 20S Subpopulationen.....	- 91 -
4.2.1 Zusammensetzung der Proteasom-Populationen gereinigt aus Rattenleber im Vergleich zu 20S aus humaner Leber und Hepatocyten	- 94 -
4.2.2 Proteolytische Prozessierung von Peptidsubstraten durch Subtypen <i>in vitro</i>	- 95 -
4.3 Unterschiedliche Eigenschaften von Proteasom-Subtypen in Abhängigkeit des Alters	- 99 -
4.3.1 Veränderungen von Subtypen in Abhängigkeit des Alters	- 99 -
4.3.2 Veränderte proteolytische Prozessierung von Peptiden durch Subtypen in Abhängigkeit des Alters.....	- 101 -
4.4 Schlussfolgerung	- 103 -
LITERATURVERZEICHNIS.....	- 105 -
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	- 119 -
ANHANG	- 121 -
DANKSAGUNG	- 127 -
PUBLIKATIONEN.....	- 128 -
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	- 129 -

Zusammenfassung

Ein wesentlicher Teil des Abbaus intrazellulärer Proteine wird durch das Ubiquitin-Proteasom-System katalysiert, das dadurch an vielen grundlegenden zellulären Prozessen entscheidend beteiligt ist. Der Kernkomplex dieses Enzym-Systems ist das 20S Proteasom, das je nach seiner Untereinheitenkonfiguration in drei Populationen unterteilt werden kann, die gewebe- und zellspezifisch unterschiedlich nachgewiesen werden können: erstens, Standardproteasomen, die die Standarduntereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ enthalten, zweitens Immunproteasomen, bei denen die Standarduntereinheiten gegen die Immununtereinheiten $\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$ ausgetauscht sind. Die dritte Population sind die Intermediärproteasomen, in denen neben Standarduntereinheiten auch Immununtereinheiten nachweisbar sind. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Rattenleber ausschließlich Intermediärproteasomen vorhanden sind, die sich aufgrund unterschiedlicher Oberflächenhydrophobizität in drei Subpopulationen unterteilen lassen. Subpopulation I und III bestehen aus Proteasomen, die neben geringen Mengen $\beta 1$ und $\beta 5$ hauptsächlich $\beta 1i$ und $\beta 5i$ enthalten. Subpopulation II besteht aus Proteasomen, in denen neben den Standarduntereinheiten nur $\beta 5i$ nachweisbar ist.

Jede dieser Subpopulationen konnte aufgrund unterschiedlicher Oberflächenladung in bis zu 5 verschiedene Proteasom-Subtypen unterteilt werden, die wiederum unterschiedliche Mengen an Standard- und Immununtereinheiten enthalten. Die 15 verschiedenen Subtypen unterscheiden sich bezüglich ihrer spezifischen Aktivitäten gegenüber kleinen fluorogenen Peptidsubstraten und Polypeptid-Substraten. Unterschiede wurden auch bezüglich ihrer Peptid-Spleiß-Aktivitäten nachgewiesen. Diese Befunde deuten auf funktionelle Unterschiede zwischen den Proteasom-Subtypen und -Subpopulationen hin.

In der vorliegenden Arbeit wurden darüber hinaus Veränderungen der Spektren proteasomaler Subtypen- und ihrer Eigenschaften im Lebergewebe von 2, 8 und 23 Monate alten Ratten nachgewiesen. Während die Gesamtmenge der Leber-Proteasomen mit steigendem Alter abnimmt, nimmt die Menge der Subtypen mit integrierten Immununtereinheiten zu. Gleichzeitig kommt es zu einer altersabhängigen Zunahme der Hydrolysegeschwindigkeit gegenüber Polypeptide-Substraten sowie veränderten Schnitthäufigkeiten.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die altersabhängigen intramolekularen Umgestaltungen von Leberproteasomen eine funktionelle Anpassung an die altersbedingten zellulären Veränderungen darstellen. Diese Anpassungsfähigkeit des Proteasomen-Systems könnte eine Erklärung für die in der Literatur publizierten, teilweise widersprüchlichen Charakteristika, von Leberproteasomen sein.

1. Einleitung

1.1 Das Ubiquitin-Proteasom System

Physiologische Prozesse in Zellen sind unter anderem durch Auf- und Abbau von Proteinen streng reguliert. Der Abbau falschgefalteter Proteine oder jener mit kurzer Halbwertszeit erfolgt durch einen ATP- abhängigen Prozess über das Ubiquitin-Proteasom System (Hershko and Ciechanover, 1998). Neben dem aus 76 Aminosäuren aufgebauten Ubiquitin sind an diesem Prozess verschiedene Enzyme, sowie unter anderem das Proteasom, beteiligt.

Für den Abbau vorgesehene Proteine werden durch die Bindung von Ubiquitin markiert. Die Ubiquitinylierung wird durch drei Enzyme katalysiert, die der Reihenfolge nach als E1-E3 bezeichnet werden (Coux et al., 1996; Kloetzel et al., 1999). Im ersten Schritt wird Ubiquitin durch Bindung an das Enzym über eine Thioesterbindung am Cystein des E1 und der carboxyterminalen Gruppe des Ubiquitins energieabhängig aktiviert. Im nächsten Schritt wird das aktivierte Ubiquitin auf die E2-Ligase übertragen, von der es dann, vermittelt durch E3, auf das Zielprotein durch Bildung einer Isopeptidbindung zwischen Lysin des Proteins und dem Glycin des Ubiquitins übertragen wird (Hershko and Ciechanover, 1998). Das globuläre Ubiquitin, aus dessen Struktur lediglich die C-terminalen Aminosäuren hervorragen, wird über das Glycin an Position 76 der Aminosäurekette an Proteine gebunden. Die Vernetzung von Ubiquitinmolekülen erfolgt über verschiedene Lysinreste. Das polyubiquitinierte Protein wird vom 26S Proteasom erkannt und ATP-abhängig entfaltet (Tanaka, 1998). Es folgt der Abbau des Proteins im katalytischen Zentrum des Proteasoms, dem 20S Kernkomplex.

1.1.1 Das 20S Proteasom

Das 20S Proteasom, ein multikatalytischer 700 kDa großer Proteinkomplex, besteht aus vier heptameren Ringen, die eine zylinderförmige Struktur bilden. In Eukaryoten setzen

sich die äußeren beiden Ringe aus sieben verschiedenen α -Untereinheiten (α_1 - α_7) zusammen. Die inneren Ringe, aufgebaut aus sieben β -Untereinheiten (β_1 - β_7), beinhalten jeweils drei Untereinheiten mit proteolytischer Aktivität (Groll et al., 1997). Da diese sich bezüglich ihrer Spezifität unterscheiden, werden sie als chymotrypsinähnliche (β_5 , Spaltung nach hydrophoben Resten), trypsinähnliche (β_2 , Spaltung nach basischen Resten), sowie caspaseähnliche Aktivität (β_1 , Spaltung nach sauren Resten) bezeichnet (Dahlmann et al., 1985; Dick et al., 1998; Wilk and Orlowski, 1983). Die außen gelegenen α -Ringe bilden eine Öffnung, durch welche das Substrat Zugang zur katalytischen Kammer mit den aktiven Zentren des Proteasoms erlangt (Groll et al., 1997). Liegt das 20S Proteasom als freier Komplex vor, so verschließen die N-Termini der α -Untereinheiten diese Öffnung. Durch Assoziation des Proteasom-Aktivators PA28 oder des 19S Komplexes an die α -Untereinheiten kommt es durch Konformationsänderungen zur Öffnung des Ringes (Groll et al., 2000). Durch Stimulierung mit $\text{INF}\gamma$ werden die Immununtereinheiten β_{1i} , β_{2i} und β_{5i} exprimiert (Glynne et al., 1991; Kelly et al., 1991) und bei der Biogenese von 20S Proteasomen anstelle der austauschbaren Standarduntereinheiten integriert, wodurch Immunproteasomen entstehen (siehe Abb. 1; Aki et al., 1994).

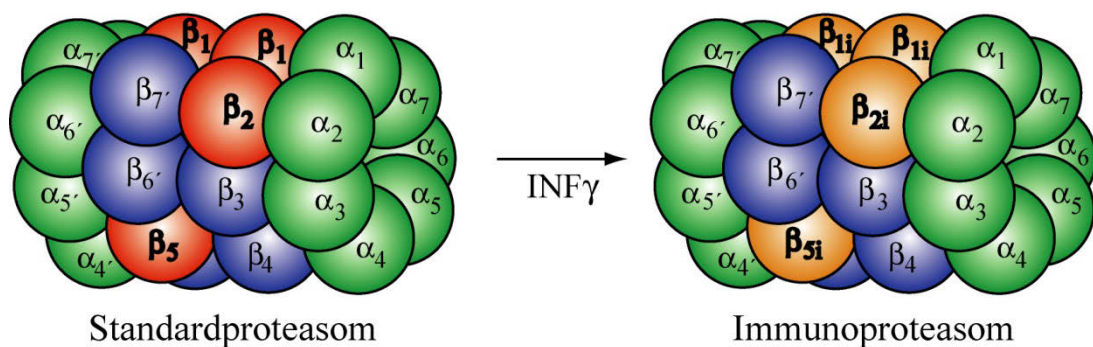


Abb. 1: Aufbau des 20S Proteasoms. Der Kernkomplex besteht aus vier heptameren Ringen. Die inneren Ringe bestehend aus den sieben verschiedenen β -Untereinheiten enthalten die katalytisch aktiven Zentren β_1 , β_2 sowie β_5 . Durch $\text{INF}\gamma$ -Stimulation werden statt der Standarduntereinheiten die Immununtereinheiten in das reifende Proteasom integriert. Das β_{1i} , β_{2i} sowie β_{5i} enthaltene 20S Proteasom wird als Immunproteasom bezeichnet, **modifiziert nach (Kloetzel, 2004)**

Die so gebildeten Immunproteasomen zeigen veränderte Hydrolyseraten gegenüber Standardproteasomen (Kloetzel and Ossendorp, 2004). Häufig wurde beobachtet, dass

die Schnittfrequenz des Immunproteasoms nach sauren Aminosäureresten im Vergleich zum Standardproteasom stark reduziert ist, im Gegensatz dazu erhöht sich die Affinität zu basischen und hydrophoben Resten (Gaczynska et al., 1993). Dieser bei Verwendung von kurzen Peptidsubstraten beobachtete Effekt verringert sich jedoch beim Abbau längerer Peptidsubstrate. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass noch andere Faktoren die Spaltspezifität des Proteasoms beeinflussen (Toes et al., 2001).

1.1.2 Der Proteasom-Regulator PA700 (19S)

Die Aktivität des 20S Proteasoms wird durch verschiedene Proteinkomplexe reguliert. Durch die Anlagerung dieser Regulatoren an die α -Ringe kommt es zu einer Öffnung der α -Ring-Pore, wodurch dem Substrat der Zugang zum aktiven Zentrum des Proteasoms ermöglicht wird (Kloetzel and Ossendorp, 2004; Whitby et al., 2000).

Der 19S Regulatorkomplex (PA700) besteht aus dem „Lid“, der vermutlich allosterisch die Aktivität der deubiquitinierenden Untereinheit RPN11 reguliert, sowie dem „Base“, einem hexameren Ring aus AAA-ATPasen, die durch ATP-Bindung und Hydrolyse die Energie für die Entfaltung und den Einzug des Substrates ins Proteasom liefern. Die Ubiquitin-Rezeptoren RPN10 und 13 binden je eine Ubiquitineinheit und es folgt simultane Deubiquitinierung durch RPN11 (Glickman et al., 1999; Lander et al., 2012; Tanaka, 1998).

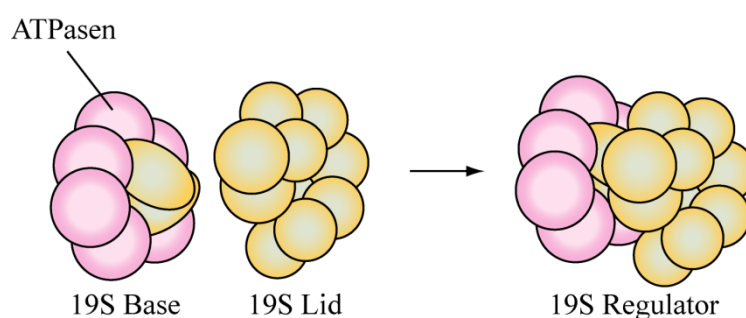


Abb.2: Bei Bildung des 26S – bzw. 30S Proteasoms wird unter anderem der 19S Regulator an den Kernkomplex gebunden. Er besteht aus dem sog. „Base“, einem hexameren Ring aus AAA-ATPasen (Rpt 1-6) und vier Nicht-ATPase Untereinheiten (Rpn 1, 2, 10 und 13) sowie dem „Lid“ bestehend aus neun Nicht-ATPase-Untereinheiten (Rpn3, Rpn 5-12 sowie Rpn15). Aufgabe des Regulators ist die Bindung ubiquitinylierter Substrate sowie deren Entfaltung und Deubiquitinylierung. Durch Öffnung der α -Ring-Pore wird das Substrat dann dem Kernkomplex zur Spaltung zugeführt.

Modifiziert nach (Kloetzel, 2004)

Die ATP-abhängige Bindung zweier 19S Komplexe an die α -Ringe des Proteasoms führt zur Bildung des 30S Proteasoms (Orino et al., 1991; Yoshimura et al., 1993). Die

Hydrolyse des ATPs hat eine Dissoziation der Komplexe zur Folge. Aus diesem Grund wurde postuliert daß die Subkomplexe dynamischen Interaktionsprozessen unterliegen.

1.1.3 Der Proteasom-Aktivator PA28

Ein weiterer Regulator, bestehend aus heptameren Ringen, die aus α - und β -Untereinheiten aufgebaut sind, wurde bereits 1992 von den Gruppen DeMartino und Rechsteiner identifiziert.

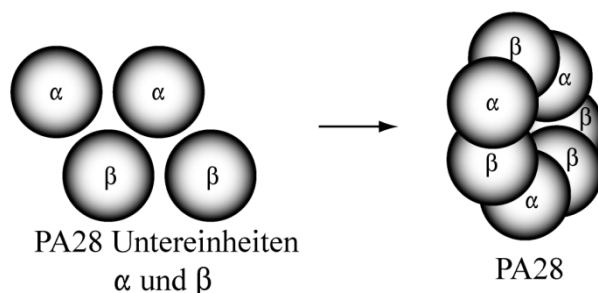


Abb.3: Der Proteasomaktivator PA28 setzt sich aus sieben α - bzw. β -Untereinheiten zusammen, deren Expression durch IFN γ stimuliert wird. Die Stöchiometrie der Untereinheiten kann variieren, **modifiziert nach (Kloetzel, 2004; Kloetzel et al., 1999)**

Dieser PA28 genannte Regulator (11S Regulator) interagiert nicht wie der 19S-Regulator mit polyubiquitinierten Substraten, sondern stimuliert ATP-unabhängig den Abbau von Peptidsubstraten (Dubiel et al., 1992; Ma et al., 1992). Durch die Bindung des PA28 an das 20S Proteasom werden sowohl proteolytische Eigenschaften des Proteasoms als auch die Geschwindigkeit des Abbaus der Peptide verändert, jedoch bleibt die Gesamtmenge an Produkten identisch (Dick et al., 1996; Groettrup et al., 1996b). Die Expression der Untereinheiten des PA28 wird ähnlich wie die Immununtereinheiten des Proteasoms durch IFN γ stimuliert (Realini et al., 1994a). Neben den Immununtereinheiten spielt PA28 eine wichtige Rolle bei der Bildung von MHC Klasse I Liganden (de Graaf et al., 2011).

Verantwortlich für die Anlagerung des Aktivators scheint der carboxyterminale Rest der α -Untereinheiten zu sein. Wird dieser Aminosäurerest durch Carboxypeptidasen abgespalten, so verliert PA28 seine aktivierende Funktion bezüglich des Proteasoms (Song et al., 1996). Ein weiteres strukturell wichtiges Motiv des Aktivators ist das sog. KEKE-Motiv, welches ebenfalls nur in α -Untereinheiten zu finden ist (Realini et al., 1994b). Das gleiche Aminosäuremuster ist auch in α -Untereinheiten des Proteasoms zu finden (Realini et al., 1994b). Ohne die beschriebenen Sequenzen können keine aktiven

PA28-20S Komplexe gebildet werden (Kuehn and Dahlmann, 1996). Auch ein Einfluss des Phosphorylierungsgrades des PA28 auf die Aktivität des Komplexes wurde postuliert (Li et al., 1996).

Neben der Existenz der PA28-20S-Proteasom-Komplexe sowie der 26S Proteasomen wurde auch das Vorkommen von Hybridproteasomen beobachtet, die aus einem 20S Kernkomplex bestehen, der an einem α -Ring PA28 bindet, an dem anderen jedoch den 19S Regulator (Hendil et al., 1998; Tanahashi et al., 2000). Die genaue Funktion des Hybridproteasoms bleibt zu analysieren, es könnte jedoch eine wichtige Rolle in Bezug auf die Antigenpräsentation spielen (Cascio et al., 2002).

1.1.4 Assemblierung von 20S Proteasomen

Die Assemblierung des 20S Proteasoms ist in Eukaryoten ein streng regulierter Prozess, der die Unterstützung zahlreicher Helferproteine erfordert. Im ersten Schritt der Proteasomreifung bildet sich vermutlich der α -Ring, unterstützt durch die Heterodimere PAC¹1/2 sowie PAC3/4 (Hirano et al., 2006; Hirano et al., 2005; Le Tallec et al., 2007). Das Dimer PAC3/4 vermittelt dabei die Anlagerung der β -Untereinheiten an den α -Ring, unterstützt durch das Chaperon POMP² (Burri et al., 2000; Witt et al., 2000). Der initiale Schritt der Anlagerung der β -Untereinheiten an den α -Ring ist die Bindung der Untereinheit β_2 an POMP (Fricke et al., 2007; Hirano et al., 2008). So entstehen proteolytisch inaktive Intermediate aus Halbproteasomen, die durch Autokatalyse der Propeptide aktiviert werden (Schmidtke et al., 1996). Alle β -Untereinheiten außer β_3 und β_4 werden als Propeptide mit N-terminalen Prosequenzen synthetisiert, durch die eine Acetylierung des katalytisch wichtigen Thr-Restes der Propeptide verhindert wird (Arendt and Hochstrasser, 1999). Nach der autokatalytischen Aktivierung folgt die Dimerisierung der Vorläuferkomplexe zum reifen 20S Kernkomplex (Abb.4; (Frentzel et al., 1994).

1.1.5 Inkorporation von Immununtereinheiten

¹ Proteasome assembly chaperone

² Proteasome maturation protein

Die *de novo* Assemblierung der Immunproteasomen verläuft nach einem ähnlichen Prinzip wie die des Standardproteasoms (siehe 1.1.4). Dabei werden statt der Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ die Immununtereinheiten $\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$ eingebaut (Frentzel et al., 1994; Groettrup et al., 1996a). Die Inkorporation der Untereinheiten erfolgt dabei kooperativ. Der Einbau der Untereinheit $\beta 2i$ ist abhängig von der Inkorporation des $\beta 1i$, während der Einbau des $\beta 5i$ unabhängig erfolgt (Groettrup et al., 1997). $\beta 5i$ spielt aber eine Rolle bezüglich der Prozessierungskinetik sowie der Reifung des Immunproteasoms (Griffin et al., 1998; Groettrup et al., 1996a), indem es die effiziente Prozessierung von $\beta 1i$ vermittelt. Griffin et al konnten in $\beta 5i$ defizienten Zellen Akkumulation der unprozessierten Untereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 2i$ beobachten (Griffin et al., 1998). Dieser Prozess könnte nicht nur für die Bildung von Immunproteasomen wichtig sein, sondern auch die Bildung sogenannter Intermediär-Proteasomen ermöglichen, die sowohl Immun- als auch Standarduntereinheiten enthalten. Diese Proteasomen-Klasse könnte eine wichtige Rolle im Verlauf der viralen Abwehrreaktion spielen (Griffin et al., 1998).

Vergleicht man die Geschwindigkeit der Bildung von Standard- und Immunproteasomen, so ist zu erkennen, dass die Reifung der Immunproteasomen erheblich schneller verläuft (Heink et al., 2005). Sie ist stark von der Prozessierung von $\beta 5i$ und dessen Interaktion mit POMP abhängig (Heink et al., 2005). Kingsbury et al vermuteten, dass die Bildung des Immunproteasoms außerdem durch eine eindeutige Präferenz des Einbaus von $\beta 5i$ im Vergleich zur Standarduntereinheit $\beta 5$ in die Präkomplexe begünstigt (Kingsbury et al., 2000). Nach Untersuchungen von Joeris et al zeigte sich jedoch, dass aufgrund der hohen Chaperon-Aktivität des $\text{pro}\beta 5i$ nicht nur die Bildung von Immunproteasomen nach Infektionen allgemein gesteigert wird, sondern auch die Bildung von Intermediärproteasomen (Joeris et al., 2012).

1.1.6 Subpopulationen und Subtypen des 20S Proteasoms

Falkenburg und Klotzel konnten als erste nachweisen, dass sich aus *Drosophila* isolierte 20S Proteasomen in verschiedene Subpopulationen unterteilen lassen, die unterschiedliche enzymatische Eigenschaften aufweisen (Falkenburg and Klotzel, 1989). Anfang der 90iger Jahre wurden Proteasomen aus unterschiedlichen Geweben und Zellkompartimenten ebenfalls in unterschiedliche Proteasom-Populationen und -klassen getrennt (Frentzel et al., 1993; Seelig et al., 1993). Diese unterscheiden sich

sowohl in ihren chromatographischen, als auch in ihren proteolytischen Eigenschaften (Seelig et al., 1993).

Auch bei Reinigung von Proteasomen aus einem Gewebe können 20S Proteasom-Typen mit unterschiedlichen proteolytischen Eigenschaften isoliert werden, die sich bezüglich der Untereinheitenkonfiguration unterscheiden (Dahlmann et al., 2000; Drews et al., 2007; Kloss et al., 2009). Durch Verfeinerungen der Aufarbeitungsprozedur des 20S Proteasoms konnten Kloss et al 2009 aufgrund der Oberflächen-Hydrophobizitäten drei verschiedene proteasomale Subpopulationen aus Gewebe aufgereinigen. Im Anschluss an diese Vortrennung wurde jede Subpopulation über Anionenaustauscher in bis zu sechs verschiedene Subtypen getrennt, die unterschiedliche proteolytische Eigenschaften sowie unterschiedliche Hemmbarkeit aufwiesen (Kloss et al., 2009). Die große Variabilität proteasomaler Subtypen ist nicht nur durch die unterschiedliche Untereinheitenkonfiguration zu erklären. Vermutlich lassen sich Subtypen aufgrund individueller posttranslationaler Modifikationen wie Glycosilierungen und Phosphorylierungen voneinander trennen (Schmidt et al., 2006). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass sich die Subtypenmuster der einzelnen Zellkompartimente voneinander unterscheiden (Klare et al., 2007). Aufgrund dieser Befunde wird in der vorliegenden Arbeit die Gesamtheit der Proteasomen wie in Tabelle 1 dargestellt klassifiziert.

Proteasomen-Systematik	Bezeichnung	Eigenschaften
Proteasomen-Komplexe	20S/26S/30S/Hybrid/ PA28-20S-PA28	unterschiedliche Regulatoren unterschiedliche spezifische Aktivität
Proteasom-Populationen	Standard/Immuno/Intermediär	unterschiedliche katalytische β -Untereinheiten unterschiedliche spezifische Aktivität
Proteasom-Subpopulationen	Sub I; Sub II; Sub III	unterschiedliche Untereinheitenkonfiguration unterschiedliche spezifische Aktivität unterschiedliche Hydrophobizität
Proteasom-Subtypen	I.2; I.3; II.2; II.3 usw.	unterschiedliche Untereinheitenkonfiguration verm. unterschiedliche posttranslationale Modifikation unterschiedliche spezifische Aktivitäten

Tab.1: Systematik der Proteasomen

Subtypenpopulationen in Zellen scheinen nicht statisch zu sein, denn im Krankheitsfall, z.B. nach Induktion von Diabetes mellitus in der Ratte, verändert sich sowohl die Aktivität als auch das Subtypen-Spektrum der 20S Proteasomen in der

Skelettmuskulatur (Merforth et al., 2003). Der Einfluss des Alters auf die Subtypenverteilung und –funktion wurde bisher nicht untersucht.

1.2 Das Proteasom-System und die zelluläre Immunantwort

Proteolyse von falschgefalteten oder mutierten Proteinen, sowie auch der Abbau von Proteinen, die an regulatorischen Prozessen in der Zelle beteiligt sind, sind wichtige Prozesse zur Aufrechterhaltung der zellulären Integrität. Auch virale Fremdproteine werden mittels Proteasomen abgebaut. Viele der entstehenden Peptide werden an MHC Klasse I Moleküle gebunden und auf der Zelloberfläche präsentiert (Rock et al., 1994; Sijts et al., 1996). Im Falle der Präsentation von Proteinfragmenten nicht zelleigenen Ursprungs werden diese von cytotoxischen T-Lymphocyten (CTL) erkannt, so daß infizierte oder geschädigte Zellen durch Lyse beseitigt werden können. Das Ubiquitin-Proteasom System spielt somit eine zentrale Rolle bei der Bildung von MHC Klasse I Epitopen.

1.2.1 Die Antigenpräsentation

Durch Abbau von Proteinen mittels des Proteasoms werden im Cytosol unter anderen auch Peptide mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren generiert, die via TAP³-Transporter in das endoplasmatische Reticulum (ER) transportiert werden (Kloetzel, 2001). Besitzen die generierten Peptide hydrophobe oder basische C-terminale Aminosäuren, besteht eine erhöhte Chance, daß diese Peptide an MHC Klasse I Moleküle gebunden werden. Die beladenen MHC Moleküle werden mittels vesikulären Transportes durch den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert (Abb. 4).

In Folge der Inkorporation der Immununtereinheiten sowie der Assoziation von PA28 an das 20S Proteasom werden die katalytischen Eigenschaften des Proteasoms in Richtung einer erhöhten MHC I Epitop-Bildung verändert (Deol et al., 2007; Strehl et al., 2005). Der Anteil der Immununtereinheiten und des PA28 an der MHC Klasse I Ligandenbildung sind additiv. PA28 könnte durch koordinierte Doppelschnitte die

³ Transporter associated with antigen processing

Bildung der Epitope forcieren, während mittels des Einbaus von Immununtereinheiten in 20S Proteasomen die Schnittpräferenzen in Richtung gesteigerter Epitopbildung verändert werden (de Graaf et al., 2011; Dick et al., 1996).

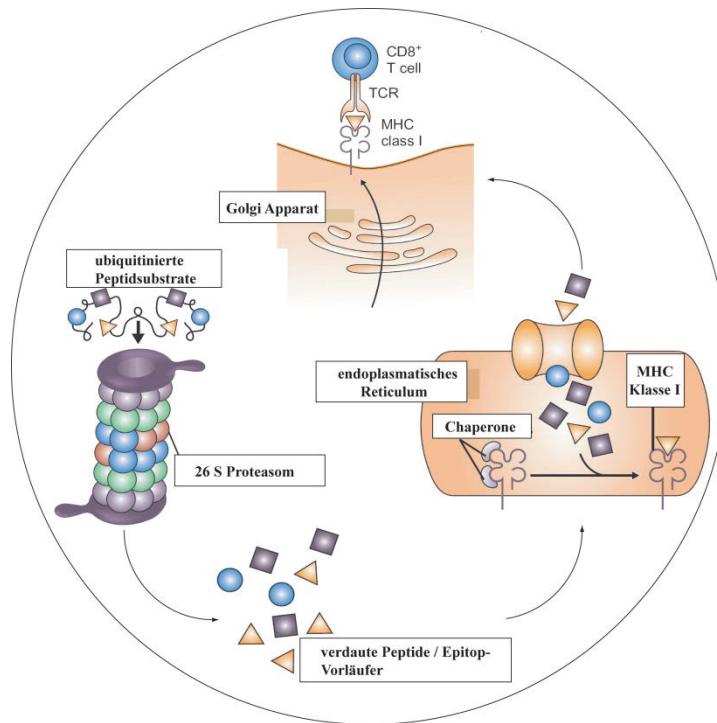


Abb.4: schematische Darstellung der Antigenpräsentation: ubiquitinierte Peptidsubstrate werden durch das Proteasom verdaut. Die entstehenden Peptidfragmente werden im ER an MHC Klasse I gebunden. Die so beladenen Moleküle gelangen über Transporter in der ER-Membran zum Golgi-Apparat. Im Anschluss können die Peptide dann an der Zelloberfläche präsentiert werden. **Modifiziert nach (Kloetzel, 2001, 2004)**

Die Analyse der Schnittpräferenzen des Proteasoms konnte in zahlreichen *in vitro* Studien durch die Verwendung von verschiedenen Polypeptid-Substraten analysiert werden. Dabei wurden synthetisch hergestellte Peptide mit Proteasomen inkubiert und die durch proteolytischen Abbau entstehenden Fragmente mittels HPLC und ESI analysiert (Burlet-Schiltz et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass einige der Peptide, die via MHC Klasse I auf der Zelloberfläche präsentiert werden, ausschließlich von Immunproteasomen oder Standardproteasomen gebildet werden können (Chapiro et al., 2006).

1.2.2 Peptid-Spleißen durch verschiedene Proteasom-Typen

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die präsentierten Peptide nicht nur auf

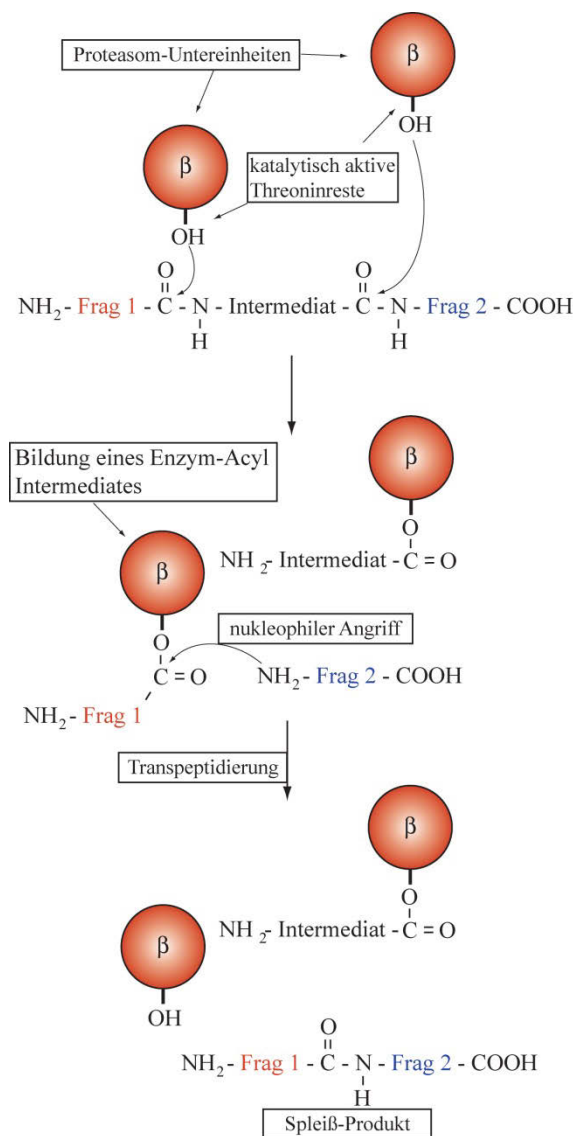


Abb. 5: Dargestellt sind katalytisch aktive β -Untereinheiten mit der OH-Gruppe der Seitenkette des N-terminalen Thr. Im ersten Schritt der Spleißreaktion wird das intermediäre Fragment ausgeschnitten, es folgt die Bildung eines Enzym-Acyl-Intermediates mittels einer Ester-Bindung aus dem N-terminalen Fragment des finalen Epitopes sowie dem Thr der β -Untereinheit. Durch einen nukleophilen Angriff auf die Esterbindung durch das freie N-terminale Ende des anderen Fragmentes wird eine neue Peptidbindung in einer Transpeptidierungsreaktion gebildet, **modifiziert nach (Dalet et al.)**

dem konventionellen Weg (1.2.1) generiert werden können, sondern auch durch Verknüpfung (Spleißen) zweier Peptidfragmente, die im Vorläuferpeptid nicht als zusammenhängende Sequenz zu finden sind. Dieser Prozess des Peptid-Spleißens (*peptide splicing*) wurde bereits für verschiedene Modellpeptide beschrieben (Dalet et al.; Vigneron et al., 2004). Die Vorläuferpeptide werden durch das Proteasom produziert, welches ebenfalls die Spleißreaktion katalysiert. In weiteren Studien konnte beobachtet werden, dass die generierten Fragmente nicht nur direkt zusammengefügt werden können. Im Zuge einer Transpeptidierung, die wie die direkte Spleißreaktion durch das Proteasom vermittelt wird, werden Peptidfragmente in umgekehrter Reihenfolge miteinander verbunden (Warren et al., 2006).

Der Spleißprozess beginnt mit der Abspaltung des Peptids welches zwischen den Spleißpartnern liegt. Das N-terminale Fragment des in Bildung befindenden Epitops

bleibt über eine Esterbindung an einen Threoninrest der Seitenkette der katalytischen β -Untereinheit des Proteasoms gebunden und bildet ein Enzym-Acyl-Intermediat.

Diese Reaktion wurde bereits früher als Reaktionsmechanismus des Proteasoms beschrieben (Groll and Huber, 2003). Der Bildung des Intermediates folgt ein nukleophiler Angriff auf die Esterbindung durch den freien N-Terminus des anderen Fragmentes, wodurch eine neue Peptidbindung durch Transpeptidierung gebildet wird (Vigneron et al., 2004). Dieser Prozess konkurriert mit der während der normalen Proteolyse von Peptiden auftretenden Hydrolyse des Intermediates.

Die Transpeptidierung scheint jedoch aufgrund der räumlichen Nähe der Peptide die bevorzugte Reaktion zu sein. Die Energie für diese Reaktion stammt aus dem nukleophilen Angriff auf die Esterbindung (Vigneron et al., 2004). Die Effektivität dieser Reaktion ist sehr hoch, wenn das intermediäre Peptidfragment nicht groß ist. Dennoch konnte die Reaktion auch für Peptidfragmente beobachtet werden, die im Vorläuferpeptid weit auseinander liegen oder sogar aus unterschiedlichen Vorläufern stammen (Dalet et al., 2010).

Die verschiedenen Studien zeigen eindeutig, dass das Proteasom unerlässlich für die Bildung der Spleißprodukte ist. Immun- und Standardproteasomen katalysieren die Bildung der bislang untersuchten gespleißten Peptide in unterschiedlichem Maß (Dalet et al., 2011; Dalet et al., 2010). Bis heute ist nicht bekannt, ob die verschiedenen Subtypen sich durch Bildung von gespleißten Produkten unterscheiden und ob der Proteasom-Aktivators PA28 Einfluss auf die Bildung von gespleißten Peptiden hat.

1.3 Das Proteasom-System der Leber

In der Vergangenheit wurden die Eigenschaften intermediärer Proteasomen bereits analysiert und verglichen. Die aus verschiedenen Rattengeweben isolierten intermediären Subtypen weisen unterschiedliche enzymatische Eigenschaften auf (Dahlmann et al., 2000; Schmidt et al., 2006, Kloss et al., 2009).

Proteasomen, die aus Leber isoliert werden können, sind ausschließlich Intermediärproteasomen und zeigen eine hohe Diversität (Dahlmann et al., 2000; Schmidt et al., 2006). Rattenherzgewebe enthält drei Subpopulationen, von denen die Subpopulationen I und III ebenfalls Intermediärproteasomen sind und sich jeweils in mehrere Subtypen trennen lassen (Kloss et al., 2009). Es ist interessant zu analysieren,

ob sich die Intermediärproteasomen der Leber in ebenso viele Subtypen mit unterschiedlichen Eigenschaften unterteilen lassen.

1.3.1 Aufbau und Funktion der Leber

Die Leber ist das zentrale Organ im Stoffwechsel bei Wirbeltieren. Dieses Organ, gleichzeitig die größte Drüse im menschlichen Körper, ist neben der Produktion einer Vielzahl von Serum-Proteinen, der Speicherung von Glykogen, der Produktion der Gallenflüssigkeit und dem Abbau von Stoffwechselprodukten auch beteiligt an dem Abbau von Endo- und Xenobiotika. Alle genannten Funktionen erfolgen in Hepatocyten, der Hauptzellpopulation der Leber.

Über die an ihrer Unterseite gelegene Leberpforte wird durch die Leberarterie sauerstoffreiches Blut in die Leber transportiert (Schünke, Prometheus - Lernatlas der Anatomie, Thieme Verlag 2005). Drei viertel des in die Leber transportierten Blutes werden dem Organ über die Pfortader zugeführt, das Nahrungsbestandteile aus dem Darm sowie Abbauprodukte aus der Milz und Hormone der Bauchspeicheldrüse enthält (McCuskey, 2000).

Jeder der vier Leberlappen ist wiederum in 1-2 mm große Leberblättchen unterteilt, die hauptsächlich aus Hepatocyten aufgebaut sind. Diese besitzen meistens mehrere Zellkerne und sind in Strängen angeordnet. Zwischen diesen Strängen befinden sich Lebersinusoiden, durch die Nährstoffe, Abfallprodukte und Gifte enthaltenes Blut zur Zentralvene der Leber transportiert wird (Abb. 6).

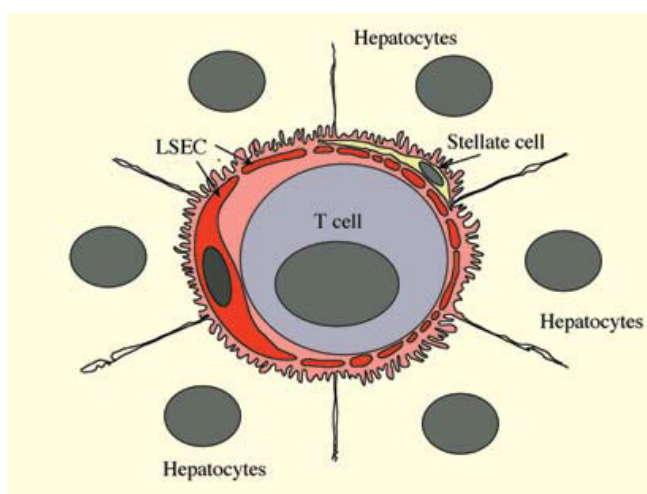


Abb. 6: Schematischer Aufbau eines Lebersinusoids. Die Sinusoidwand ist aufgebaut aus sinusoidalen Endothelzellen (LSEC), die das sinusoidale Blut von den Hepatocyten trennen. Über cytoplasmatische Auswüchse sind Stellatumzellen im Disse-Raum mit den LSEC's verbunden. Im sinusoidalen Lumen befinden sich neben naiven T-Zellen auch die Kupfer-Zellen, die durch rezeptorvermittelte Endocytose und Phagozytose Antigene aufnehmen und durch Antigenpräsentation die T-Zellen aktivieren (Knolle and Gerken, 2000).

Über rezeptorvermittelte Endocytose und Phagozytose nehmen Kupfer-Zellen Antigene aus dem Blut auf und aktivieren per Antigenpräsentation die in den

Sinuosiden befindlichen naiven T-Zellen. Die Sinusoidwand wird aus Endothelzellen (*liver sinusoidal endothelial cells*, LSEC) gebildet, die das sinuoidale Blut aus der Pfortader von den Hepatocyten trennen (Knolle and Gerken, 2000). Diese Zellen bilden ein gefenstertes Endothel, über das Plasmaproteine und andere Substanzen des Plasmas per Diffusion in den Disse-Raum gelangen können und so den Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatocyten ermöglichen. Im Disse-Raum liegende Stellatum-Zellen (Ito-Zellen) nehmen Vitamin A und Fette zur Speicherung auf. Auf der anderen Seite des Disse-Raums befinden sich die Hepatocyten. Aus Lebergewebe isolierte Proteasomen stammen somit zum größten Teil aus Hepatocyten sowie zu einem kleinen Teil aus LSEC's, Kuppfer-, Stellatum- und T-Zellen etc.

1.3.2 Veränderung der Leber im Alter

Altern Zellen und Gewebe, so verlieren sie lebenswichtige zelluläre Funktionen sowie die Fähigkeit der Regeneration, was zum Zelltod führt. Die Leber ist ein Organ mit sehr hohem Regenerationspotenzial. Selbst nach Transplantationen von Teilen der Leber regenerieren sich diese zu einem funktionierenden Organ. Im Lauf des Alterungsprozesses jedoch treten in der Leber neben morphologischen auch deutliche funktionelle Veränderungen auf.

Auch wenn über einige Veränderungen der Leber sehr widersprüchliche Literatur veröffentlicht wurde, deren Ergebnisse stark von den untersuchten Organismen und deren Ernährungszustand abhängen (Schoeffner et al., 1999), konnten einige grundlegende Veränderungen der Leber im Alter festgestellt werden. Während des Alterungsprozesses kommt es zum Auftreten der „braunen Atrophie“, die durch Akkumulation des Lipofuscin gekennzeichnet ist, welches durch Oxidation ungesättigter Fettsäuren auftritt. Das Volumen der Leber nimmt im Alter bis zu 40% ab (Le Couteur and McLean, 1998; Wynne et al., 1989; Zeeh and Platt, 1990), was vermutlich auf eine Abnahme des hepatischen Blutflusses zurückzuführen ist (Wynne et al., 1987). Die Anzahl der Hepatocyten in der Leber nimmt im Alter nicht ab, aber es wurde eine Abnahme von Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen gemessen, die für die Aufnahme von Glycoproteinen in die Zellen verantwortlich sind (Daniels et al., 1987). Gleichzeitig nimmt das Volumen, die Organellenverteilung und die Pluripotenz der Hepatocyten im Alter zu (Schmucker, 2005; Schmucker et al., 1978). Neben der

Oberflächenverringering des glatten endoplasmatischen Retikulums (Veränderung der Proteinsynthese) wurden niedrigere ATP-Level und geringere Anzahl von Mitochondrien gemessen (Le Couteur et al., 2001; Sastre et al., 1996).

Die Endothelwände der Sinuositiden sind in seneszenten Organismen gegenüber denen juveniler deutlich verdickt und besitzen eine geringere Fenestrierung (Pseudokapillarisation) (Cogger et al., 2003; McLean et al., 2003). Auch das Volumen der Stellatum-Zellen nimmt im Alter zu, es kommt zu erhöhter Einlagerung von Vitamin A bei gleichzeitiger Abnahme der Vitamin A Plasmakonzentration (Schmucker, 2005), was zu verringerter Konzentration von Antioxidantien im Körper führt. In alternden Organismen sind somit vermehrt Schädigungen durch reaktive Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*, ROS) zu beobachten. Ausserdem kommt es durch die Schwellung der Stellatum-Zellen vermutlich zu einer Abnahme der Geschwindigkeit des sinusoidalen Blutflusses um bis zu 35% im seneszenten Organismus (Le Couteur et al., 2008).

Trotz dieser Veränderungen in der alternden Leber konnten in verschiedenen Studien keine alterabhängigen Verluste der Leberfunktion festgestellt werden. Obwohl die Regenerationsfähigkeit der Leber im Laufe der Seneszenz abzunehmen scheint, können viele Veränderungen durch spezielle Ernährung beeinflusst werden. Auch wenn Teile einer Leber älterer Organismen in Jüngere transplantiert werden, regenerieren die Organe wieder und zeigen normale Funktionalität (Anantharaju et al., 2002; Schmucker, 1998). Die meisten Funktionen und morphologischen Strukturen der Leber verändern sich im Alter nicht.

1.3.3 Proteasom-Populationen der Leber

Bereits im Jahr 1985 wurden 20S Proteasomen aus Rattenleber gereinigt und als Proteasen identifiziert (Rivett, 1985), die vor allem im Cytosol von Hepatocyten, Kupffer-Zellen und Endothelzellen, aber auch in den Kernen und mikrosomalen Fraktionen dieser Zellen, lokalisiert waren (Rivett et al., 1992; Tanaka et al., 1986). Die 20S Proteasomen der verschiedenen Kompartimente unterschieden sich in ihrem Gehalt der β -Untereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 2$ (Palmer et al., 1996) und bestätigten die Hypothese, dass die enzymatischen Eigenschaften aller Proteasomen die Summe der Eigenschaften

verschiedener Proteasom-Populationen eines Organs ist (Falkenburg and Kloetzel, 1989).

Im Jahr 2000 trennten Dahlmann et al (Dahlmann et al., 2000) aus verschiedenen Geweben der Ratte proteasomale Subtypen, die sich sowohl anhand der Untereinheitenkonfiguration als auch anhand ihrer proteolytischen Eigenschaften unterscheiden ließen. Aus Rattenleber wurden Subtypen gereinigt, in denen mittels 2D-Elektrophorese neben Standard- auch Immununtereinheiten nachgewiesen werden konnten, also intermediäre 20S Proteasom-Subtypen (Schmidt et al., 2006). Durch Analyse der Eigenschaften der aus Rattenskelettmuskel isolierten Subtypen wurde gezeigt, dass die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Subtypen signifikant unterschiedlich waren. Subtypen mit höherem Anteil an Immununtereinheiten zeigten gegenüber Subtypen mit hohem Anteil an Standarduntereinheiten erniedrigte caspaseähnliche Aktivität (Dahlmann et al., 2000). Durch Analyse der Prozessierung eines aus 25 Aminosäuren bestehenden Peptids des murinen Cytomegalovirus (pp89) konnte gezeigt werden, dass Skelettmuskel-Subtypen mit unterschiedlichen enzymatischen Eigenschaften Peptide durch Präferenz verschiedener initialer Schnittstellen in unterschiedlicher Geschwindigkeit abbauen (Dahlmann et al., 2000). Es ist offen, ob mit Leber-Subtypen ähnliche Ergebnisse dargestellt werden können.

Über die Veränderungen der Eigenschaften von Leberproteasomen während des Alterungsprozesses wurde widersprüchliche Literatur veröffentlicht. Untersuchungen der spezifischen Aktivitäten mit kurzen fluorogenen Peptidsubstraten zeigten entweder einen Anstieg (Shibatani et al., 1996), keine Änderung (Anselmi et al., 1998; Conconi and Friguet, 1997) oder einen Abfall (Carrard et al., 2003; Hayashi and Goto, 1998) der chymotryptischen Aktivität. Im Gegensatz dazu konnte in allen Studien festgestellt werden, dass die caspaseähnliche Aktivität in seneszenten Organismen signifikant abnimmt.

1.4 Zielsetzung

Neben dem Abbau fehlgefalteter oder mutierter Proteine ist das Proteasom unter anderem verantwortlich für die proteolytische Prozessierung von Proteinen, z.B. zur Regulation des Zellzyklus oder zur Bildung von MHC Klasse I Epitopen. Diese zentrale Rolle für die Viabilität der Zelle macht das Proteasom zu einem wichtigen pharmazeutischen Target. Proteasom-Inhibitoren werden z.B. bei der Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt (Hamilton et al., 2005) und führen in geringen Dosen zu einer Reduktion des oxidativen Stress in der Leber, der im Zuge von Alkoholmissbrauch auftritt (Bardag-Gorce et al., 2011). Da Inhibitoren auf einzelne proteasomale Subtypen mit unterschiedlicher Effizienz wirken (Kloss et al., 2009), ist es sinnvoll, die enzymatischen Eigenschaften der einzelnen Subtypen im Detail zu analysieren. Dies wird erschwert durch die Tatsache, dass sich die Zusammensetzung der Proteasom-Subpopulationen in den Zellen in Abhängigkeit der Stresssituation für die Zelle verändert (Klare et al., 2007). Auch alters- und entwicklungsabhängige Veränderungen der proteasomalen Eigenschaften wurden schon vor längerer Zeit in der Leber nachgewiesen (Ahn et al., 1991; Briane et al., 1992). Die altersabhängige Veränderung der Proteasomen-Konfigurationen könnte mit einer Erklärung für im Alter veränderte Reaktionen auf Pharmaka darstellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Proteasom-Subpopulationen und Subtypen aus Lebergewebe von Ratten verschiedener Altersstufen chromatographisch zu trennen und hinsichtlich ihrer proteolytischen Eigenschaften zu charakterisieren. Neben der Analyse ihrer Untereinheitenkonfiguration sowie der spezifischen proteasomalen Aktivitäten stand die Analyse der Schnittpräferenzen bei Abbau von synthetischen Polypeptidsubstraten im Fokus. Dieser Aspekt der proteasomalen Funktion spielt eine essentielle Rolle, da von der effektiven Bildung der MHC Klasse I Epitope das Auslösen der zellulären Immunantwort abhängt.

Die altersabhängige Veränderung der Proteasom-Subtypenspektren und deren Eigenschaften könnten Erklärungsansätze für die Entstehung altersabhängiger Veränderungen dieses lebenswichtigen Organs liefern, sowie daraus folgender Erkrankungen (Kil et al., 2010; Kwekel et al., 2010) und die Wirksamkeit von Proteasom-Inhibitoren auf den Leberstoffwechsel (Oliva et al., 2012).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

FPLC	Amersham Pharmacia
HPLC	Beckmann Coulter
SMART-System	Amersham Pharmacia
Fluorimeter Fluostar Reader mit Easy Software	SLT
OpsysMR Plattenreader	Dynert Technologies
Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf
Kühlzentrifuge RC 5C	Sorvall
Kühlzentrifuge	Sorvall
Tischzentrifuge	Neo Lab
Vortex VF2	Heidolph Instrumente
Fraktionssammler und Pumpe P1	Pharmacia
Elektrophorese Einheit Mighty Small SE250/SE260	Hoefer
Semidry-Blot-Kammer	BioRad
Stromgeber DC PS3000	Hoefer
Waagen BP210OS und MC1	Sartorius
pH-Meter	InoLab
Schüttler	Heidolph Instrumente
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph Instrumente
Massenspektrometer	Thermo Fisher
Rotoren SA-300 und SLA-300	Beckmann
Pipetten	Gilson
Pipettus-Akku	Hirschmann Laborgeräte
Ultraschall Sonoplus GM70	Bandelin
Homogenisator	Braun
Zellkulturinkubator	Heraeus
Wasserbad U3/TWB 12	Julabo
Stickstofftank	Taylor-Wharton

Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik
Blockthermostat (Thermomixer)	Eppendorf
2D-PAGE Gießstand	Hoefer

2.1.2 Reagenzien

Acetonitril	Serva
Acrylamid (30%, 29:1)	Roth
Acrylamid ultrapure	Serva
Agarose	Serva
Ammoniumsulfat	AppliChem
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Ampholine, Isodalt 3-10, 2-4 und 6-8	Serva
beta-Mercaptoethanol	Serva
Rinder-Serum Albumin Fraktion V (BSA)	Serva
Bromphenolblau	AppliChem
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
Coomassie Plus Protein Assay	Pierce
Coumarinsäure	Sigma
DEAE Sephacel	Amersham
DEPC	Roth
DMSO	Fluka
DTT	Roth
Essigsäure	Merck
Ethanol	Baker
FCS	Biochrom
Glycerol	Roth
HEPES	Roth
Isopropanol	Baker
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Serva
L-Glutamin	Biochrom

Lab-Trol-E normal	Merz-Dade Switzerland
Luminol (3-Aminophtalhydrazid)	Fluka
Magermilchpulver	Difco
Magnesiumchlorid	AppliChem
Methanol	Baker
Natriumazid	Roth
Natriumcarbonat	Sigma
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem
Natriumhydroxid	Applichem
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Polyethylenglycol 4000	Serva
Salzsäure (37%)	AppliChem
SDS	AppliChem/Serva
Suc-LLVY-MCA und Bz-VGR-MCA	Bachem Biochemica
TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylen-Amin)	Serva
Trifluoressigsäure	Fluka
Tris	Applichem
Triton-X-100	Sigma/Serva
Trypsin-EDTA	Gibcol BRL
Tween20	Serva
Wasserstoffperoxid	Roth
Z-LLE-MCA	Calbiochem

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Centricon Plus-20	Millipore
Dialyseschlauch	Serva
Falcon Röhrchen	Greiner
Gelbond Film für Agarose	Serva
Eppendorf Reagiergefäße	Eppendorf
Mikrotiter-Platten, schwarz und weiß	Greiner
Molekulargewichtsstandard, vorgefärbt	Fermentas
NativPage™ 3-12% Bis-Tris Gele	Invitrogen
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore

Röntgenfilme: Xomat-UV/AR/Biomax-MR	Kodak
Röhrchen für Preparationen FPLC und Kühlraum	Sarstedt
Sterilfilter 4,5; 0,2 µM	Schleicher & Schuell
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell
Western Blot	GE Healthcare

2.1.4 Säulen und Chromatographiematerialien

FPLC

DEAE Toyo Pearls 650 S	Tosoh Biosep GmbH
Superose TM 6B	Pharmacia Fine Chemicals
MonoQ 5/50 GL	GE Healthcare
Resource TM Phe, 1ml	GE Healthcare
Source 15Phe 4.6/100PE	GE Healthcare

SMART

Phenyl Superose [®] PC 1.6/5	Pharmacia Biotech
MiniQ PC 3.2/3	Pharmacia Biotech
Superose 6 PC3.2/30	GE Healthcare

Kühlraum

DEAE-Sephacel	Amersham Pharmacia
DEAE-Servacel	Serva
Hydroxylapatit	Amersham Pharmacia
Sepharose 6B	Amersham Pharmacia

2.1.5 Antikörper

<i>Untereinheit</i>	<i>Ursprung</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Herkunft</i>
LMP2 (ab3329)	Kaninchen	1:1000	abcam
LMP7 (ab3328)	Kaninchen	1:1000	abcam
δ (K43/7)	Kaninchen	1:1000	Kloetzel
MB1 (ab3330)	Kaninchen	1:500	abcam
IOTA (IB5)	Maus, mAb	1:1000-1:5000	Cappel
α7 (MCP72)	Maus, mAb	1:1000	Hendil
20S Proteasom, Serum 37	Ratte, Skelettmuskel	1:500	Dahlmann
20S Proteasom, Serum 87	Ratte, Leber	1:500	Dahlmann

2.1.6 Polypeptide

<i>Peptid Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>MW</i>	<i>Hersteller</i>
GP100₄₀₋₅₂	RTKAWNRQLYPEW-CONH ₂	1746.9	AG Henklein
GP100₃₅₋₅₇	VSRQLRTKAWNRQLYPEWTEAQR-COOH	2917.3	AG Henklein
GP100₂₀₁₋₂₃₀	AHSSSAFTITDQVPFSVSVSQLRALDGGNK- CONH ₂	3118.6	AG Henklein
pp89₁₆₋₄₀	RLMYDMYPHFMPPTNLGPSEKRCWMS- CONH ₂	3084.4	AG Henklein
9GPS	YPHFMPPTNLGPS	681	AG Henklein

2.2 Methoden

2.2.1 Biochemische Methoden

Männliche Wistar Ratten (2, 8 und 23 Monate alt) wurden bei Harlan Winkelmann erworben. Die Tiere wurden mittels Kohlendioxid getötet, die Lebern entnommen und bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.1 Präparation von 20S Proteasomen aus Leber (nach Schmidt, 2006)

TEAD Puffer: 20 mM Tris, 1mM EDTA, 1mM NaN₃, 1mM DTT; pH 7,4

Alle nachfolgend beschriebenen Präparationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. 50 g Rattenleber, suspendiert in 300 ml TEAD Puffer, wurden in einem Waring Blendor homogenisiert und anschließend zusätzlich für 3 x 30 sec mittels Ultraschall behandelt. Unlösliche Gewebeteile wurden bei 14000 rpm für 45 min abzentrifugiert. Die im Überstand gelösten Proteine wurden durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (0-35% und 35-75% Ammoniumsulfat) getrennt. Nach der Aufnahme des bei 35-75% Ammoniumsulfat präzipitierten Proteins in TEAD-Puffer wurde die Lösung über Nacht bei 4°C gegen TEAD Puffer dialysiert. Die Proteinlösung wurde danach auf eine mit TEAD-Puffer äquilibrierte DEAE-Sepacelsäule (Gelvolumen ca. 180 ml) aufgetragen. Die Säule wurde mit 3 Gelvolumina 0,1M NaCl gelöst in TEAD gewaschen, bevor die Elution der Proteine durch Anlegen eines linearen Gradienten (500 ml) von 0,1 - 1M NaCl in TEAD erfolgte. Das Eluat wurde in 175 Fraktionen zu je 3 ml gesammelt. Fraktionen, in denen mittels SLLVY-MCA-Hydrolyse proteolytische Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurden vereint und die darin enthaltenen Proteine erneut mittels Ammoniumsulfat gefällt und abzentrifugiert. Das in maximal 10 ml TEAD aufgenommene Protein-Pellet wurde auf eine Sepharose 6B Gelfiltrationssäule (Gelvolumen ca. 200 ml; äquilibriert in TEAD Puffer) aufgetragen und im gleichen Puffer chromatographiert (Laufzeit 16h). Es wurden Fraktionen á 2,5 ml gesammelt, in denen die chymotryptischen Aktivität bestimmt wurde. Proteasomen enthaltende Fraktionen wurden vereint. Die weitere Reinigung des Proteasoms erfolgte mittels FPLC an einer Anionenaustauschersäule (MonoQ, 1,5 ml Gelvolumen) äquilibriert in TEAD Puffer. Es wurden maximal 20 mg Protein des Sepharose-Eluats aufgetragen und gebundene Proteine durch Anlegen eines 40ml NaCl-Gradienten (0 - 0,5 M in TEAD Puffer) in 40 Fraktionen á 1 ml eluiert. Fraktionen mit chymotryptischer Aktivität wurden vereint und mit Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 1,2 M versetzt. Die Enzymlösung wurde anschließend auf eine Hydrophobizitätssäule (ResourcePhe, Gelvolumen 1 ml), die mit 1,2 M Ammoniumsulfat in TEAD äquilibriert war, aufgetragen. Pro Lauf wurden 5mg Protein chromatographiert, das durch Anlegen eines 80 ml Gradienten von 1,2 - 0 M Ammoniumsulfat gelöst in TEAD, eluiert wurde. Nach Vereinigung der aktiven Fraktionen (á 1 ml) wurde die Probe über Nacht gegen TEAD dialysiert. Die Lagerung des so gereinigten 20S Proteasoms erfolgte bei 4°C.

2.2.1.2 Präparation von PA28 aus Erythrocyten (nach Kuehn und Dahlmann, 1996)

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,5 mM NaH₂PO₄, pH 7,4

DTT: 1 mM in H₂O

Natriumdihydrogenphosphat-Puffer: 400 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, pH 7 (neutralisiert mit NaOH)

Alle nachfolgend beschriebenen Präparationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Human-Erythrocyten (Erythrocytenkonzentrat) wurden dreimal mit 3-fachem Volumen PBS gewaschen und im Anschluss 30 min in 1 mM DTT-Lösung lysiert. Nach Abzentrifugieren (90 min bei 9000 rpm im GSA Rotor) der Zelltrümmer wurde der Überstand mit 100 ml DEAE-Servacel Gel vermischt. Nach 15-minütiger Bindung der Proteine an das Gel wurden ungebundene Bestandteile mit TEAD ausgewaschen. Zur Elution der gebundenen Proteine wurde das Gel 15 min mit 500 mM NaCl in TEAD unter Rühren inkubiert. Nach dem Abfiltrieren des Gels wurden die Proteine durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung (0-30% und 30-70% Ammoniumsulfat) präzipitiert und jeweils bei 9000 rpm 30 min abzentrifugiert. Das Pellet der 30-70% Ammoniumsulfat-Fällung wurde in ca. 60 ml TEAD Puffer aufgenommen und über Nacht gegen 2 l TEAD dialysiert. Nach Abzentrifugieren von unlöslichen Bestandteilen wurde die Probe auf eine DEAE-Sephacelsäule, äquilibriert in TEAD, aufgetragen. Elution der Proteine erfolgte durch einen 500 ml Gradienten von 0 - 500 mM NaCl in TEAD (Fraktionsgröße 3,5 ml). PA28 enthaltende Fraktionen wurden anhand der Aktivierung von 20S Proteasomen aus Human-Erythrocyten durch Aktivitätsbestimmung mit dem fluorogenen Substrat SLLVY-MCA identifiziert und vereint. Die PA28 enthaltende Probe wurde im Anschluss auf eine mit 10 mM Natriumdihydrogenphosphat äquilibrierte Hydroxylapatit Säule aufgetragen. Nach Erhöhen der Natriumdihydrogenkonzentration auf 100 mM erfolgte die Elution der Proteine durch Anlegen eines Gradienten (100 ml) von 100 - 250 mM NaH₂PO₄ (Fraktionsgröße 1 ml). PA28 enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und 2 h gegen 1 l TEAD Puffer dialysiert. Nach Versetzen des Pools mit 1,2 M Ammoniumsulfat wurde die Probe an eine ResourceTM Phe Hydrophobizitätssäule gebunden und PA28 durch einen linear absinkenden Gradienten von 1,2 M - 0 M Ammoniumsulfat eluiert. Nach Vereinen der PA28 enthaltenen Fraktionen wurde der Pool gegen 1 l TEAD dialysiert. Im letzten Schritt wurden Fremdproteine von PA28 durch Chromatographie an MonoQ

abgetrennt. Chromatographiepuffer war TEAD und Elution der Proteine erfolgte mittels eines Salzgradienten von 0 bis 500 mM NaCl in TEAD. Nach erneuter Dialyse des PA28 Pools über Nacht gegen TEAD wurde das Aktivierungspotenzial des gereinigten PA28 mit 20S Proteasom aus Erythrocyten bestimmt.

2.2.1.3 Isolation von 20S Proteasom-Subtypen (nach Dahlmann, 2000)

Isolation von 20S Proteasom-Subtypen erfolgte über eine Anionenaustauschersäule (MiniQ, PC3/3.2) am SMART System von Amersham. 20 mg des aufgereinigten Proteasoms wurden an die Säule gebunden. Elution der Subtypen erfolgte durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0 - 0,5 M NaCl in TEAD. Subtypenfractionen (25 µl pro Fraktion) wurden anhand des Proteinabsorptionsspektrums vereint und über Nacht bei 4°C gegen TEAD dialysiert.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung des 20S Proteasoms mittels Bradford

10µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden in einer Mikrotiterplatte mit 100 µl Bradford-Reagenz vermischt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichkurve errechnet, die mit dem Serum-Proteingemische Lab-Trol-E gemessen wurde.

2.2.1.5 Fluorogene Bestimmung der Aktivitäten des 20S Proteasoms

Zur Bestimmung der proteasomalen Aktivitäten wurden 20µl Proteasom-Lösung mit 20µl der Substratlösung vermischt. Die Substrate SLLVY-MCA (chymotryptische Aktivität), BzVGR-MCA (tryptische Aktivität) und ZLLE-MCA (caspaseähnliche Aktivität) wurden als 10mM Stammlösungen in DMSO angesetzt. Für die Messungen wurden die Substrate mit TEAD Puffer auf Konzentrationen von 200 µM (BzVGR-MCA, ZLLE-MCA) und 100 µM (SLLVY-MCA) verdünnt. Die Lösungen wurden in schwarzen Mikrotiterplatten (96 Loch) vermischt und bei 37°C über Zeiträume von bis

zu zwei Stunden inkubiert. Während der Inkubation wird die C-terminale 4-Methyl-7-cumarylamid-Gruppe (MCA) durch die aktiven Untereinheiten des Proteasoms abgespalten, was mittels der Fluoreszenzmessung quantitativ bestimmt werden kann. Messung der Fluoreszenz erfolgte nach verschiedenen Zeitpunkten bei einer Excitationswellenlänge von 350 nm sowie Emissionswellenlänge von 450 nm. Anhand einer Standardreihe, die mit freiem MCA hergestellt wurde, konnte die spezifische proteasomale Aktivität berechnet werden.

2.2.1.6 Präzipitation von Protein

Für Polyacrylamidgelelektrophoresen wurde Proben mit einem Volumen 20% Trichloressigsäure versetzt. Nach 30 min Inkubation der Proben auf Eis wurden die Präzipitate bei 14.000 rpm für 45 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl Aceton gewaschen und unter gleichen Bedingungen für 30 min abzentrifugiert.

Für 2D-Gelelektrophoresen wurden die Proben mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Die Präzipitate wurden weiterhin wie die Proben nach TCA Fällung behandelt.

2.2.1.7 Rocket Elektrophorese (nach Weeke, 1973)

HEPES Puffer: 30 mM HEPES in ddH₂O, pH 7,8

Zur quantitativen Bestimmung des 20S Proteasom-Gehaltes in Rohextrakten wurden 1%ige Agarosegele gegossen. Diese enthielten je 0,5 % Antiserum 37 und Antiserum 87 sowie 4% PEG 4000. 10 µl der 1:5 in TEAD Puffer verdünnten Leberrohextrakte wurden auf die Gele in gestanzte Depots aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 16 h bei 50 V in einer horizontalen Elektrophoresekammer durchgeführt. Nach Inkubation der Gele mit 7,5% Essigsäure wurden die Gele gepresst und im Anschluss bei 37°C getrocknet. Die trockenen Gele wurden mit Coomassie gefärbt. Die Höhe der Präzipitate (Rockets) wurde gemessen und die Proteasomen-Menge wurde anhand einer Standardkurve (C. Baumann, med. Doktorarbeit, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 2012) ermittelt.

2.2.1.8 SDS Polyacrylamid Elektrophorese (nach Laemmli, 1970)

Sammelgel: 125 mM Tris-HCL pH 6,8; 0,1% SDS, 3 % Acrylamid-Bisacrylamid (v/v), 2,5% APS (v/v), 0,25% TEMED (v/v)

Trenngel: 0,75 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 12,5% Acrylamid-Bisacrylamid, 0,1% APS (v/v), 0,05% TEMED (v/v)

Probenpuffer: 50% Glycerin, 15% SDS, 40 mM Tris-HCl, 1M β -Mercaptoethanol, 1% Bromphenolblau, pH 6,8

10 x Laufpuffer: 3% Tris, 14% Glycerin

Färbelösung: 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 10% Methanol, 40% Essigsäure, 50% ddH₂O

Entfärber: 10% Essigsäure, 45% Ethanol, 45% ddH₂O

Für die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden 0,5 – 5 μ g der Proteasom-Proben mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Auftrag der Proben auf 12,5% SDS-Gele wurde eine Spannung von 80 V zum Durchlauf der Proben durch das Sammelgel, und eine Spannung von 120 V zum Durchlauf des Trenngels angelegt. Als Größenstandard wurden neben den Proben 5 μ l des Prestained Protein Markers aufgetragen.

Für den unspezifischen Nachweis von Protein wurden die Gele über Nacht in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und im Anschluss in Entfärber bis zur gewünschten Bandenintensität inkubiert.

2.2.1.9 Western Blot Analyse

Transferpuffer: 50 mM Tris, 40 mM Glycin

Blockierlösung: 5 % Magermilchpulver in TTBS

TTBS: 20 mM Tris, 0,5M NaCl, 1 mM NaN₃, 1% Tween-20

TBS: 20 mM Tris, 0,5M NaCl, 1 mM NaN₃

ECL: 25 μ l 90 mM p-Coumarinsäure in DMSO, 50 μ l 250 mM 3-Aminophthalhydrazid (Luminol) in DMSO, 18 ml 0,1M Tris-HCl pH 8,5, 10 μ l H₂O₂, je 1 ml Lösung A und B (Western Blot Kit, GE Healthcare)

Zur spezifischen Detektion eines Proteins wurden mittels SDS-Gelelektrophorese getrennte Proteine per Western Blot auf PVDF-Membranen übertragen. Die Membranen wurden in Methanol aktiviert und ebenso wie das Gel in Transferpuffer äquilibriert. Der Übertrag der Proteine vom Gel auf die Membran wurde im Semi-Dry Verfahren durchgeführt, bei dem eine Spannung von 16 V für 45 min angelegt wurde. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden mit 5% Magermilchpulver 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Die Bindung des primären Antikörpers erfolgte unter Schütteln über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBS wurde die Membran mit sekundärem Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBS sowie einmal in TBST wurden spezifische Antikörperreaktionen auf Röntgenfilmen mittels 1 min Inkubation der Membranen in ECL Lösung sichtbar gemacht. Exposition der Filme erfolgte je nach Stärke der Signale zwischen 10 Sekunden und 10 Minuten.

2.2.1.10 1D-Elektrophorese unter nativen Bedingungen

TSDG: 10 mM Tris, 25 mM KCl, 10 mM NaCl, 1,1 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0,1 mM EDTA, 1mM DTT, 1 mM NaN_3 , 10% Glycerin, 2 mM ATP

Bis-Tris Laufpuffer: 50 mM Bis-Tris pH 6,8, 50 mM Tricin

Probenpuffer: 50 mM Bis-Tris pH 7,2, 50 mM NaCl, 10% (w/v) Glycerin, 0,25% Bromphenolblau

Testpuffer: 30 mM Tris, 0,5 mM DTT, 1 mM NaN_3 , 5 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 10 mM KCl

Overlay-Lösung: 20 ml Testpuffer, 200 μM ATP, 100 μM SLLVY-MCA

Gewebeproben und gereinigtes Proteasom wurden mittels Elektrophorese unter nichtdenaturierenden Bedingungen (Nativ-PAGE) untersucht. Gewebeproben wurden mit TSDG Puffer versetzt und durch drei Frier-Tau Zyklen aufgeschlossen. Unlösliches Gewebe wurde bei 14.000 rpm und einer Temperatur von 4 °C 60 min abzentrifugiert. Nach wiederholter Zentrifugation des Überstandes wurde die Proteinkonzentration in den Rohextrakten per Bradford bestimmt. 10 μg der Rohextrakte bzw. 2 μg des gereinigten 20S Proteasoms wurden mit Nativ-Probenpuffer versetzt und auf NativPage™ 3-12% Bis-Tris Gelen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht

bei 40 V und 4 °C. Zur Visualisierung der Proteasom-Komplexe wurden die Gele im Anschluss 15 min bei 37 °C in Overlay-Lösung inkubiert. Nach kurzem Waschen in Testpuffer konnte die proteasomale chymotryptische Aktivität der Proteasom-Komplexe mittels UV-Illumination analysiert werden. Zur Ladekontrolle wurden die Gele im Anschluss unter Schütteln mit Coomassie-Lösung inkubiert und kurz in Wasser entfärbt.

2.2.1.11 Nativ-Western Blot

Nativ-Blotpuffer: 0,15% Tris, 3,5% Glycerin. 20% Methanol

Mittels Nativ-Gel-Elektrophorese aufgetrennte Proteine wurden auf PVDF-Membranen gebロットet, nachdem diese in Methanol aktiviert und im Anschluss ebenso wie die Nativ-Gele in Nativ-Blotpuffer äquiliбriert worden waren. Übertrag der Proteine erfolgte in der SemiDry-Blotkammer bei 12V für 45 min. Die weitere Behandlung der Membranen erfolgte wie unter 2.2.1.9 beschrieben.

2.2.1.12 2D Elektrophorese (nach O`Farrel, 1975)

Acrylamidlösung: 38% Acrylamid, 2% Methylenbisacrylamid

Gelzusammensetzung: 1,65g Harnstoff, 300 µl Acrylamidlösung, 400 µl 10% (v/v) Triton-X -100, 950 µl ddH₂O, 200 µl Servalyt 3-10, 50 µl Servalyt 6-8, 30 µl Servalyt 2-4, 9 µl TEMED, 12 µl APS

Probenpuffer: 0,57% Harnstoff, 2% Triton-X-100, 0,14% Servalyt 3-10, 0,4% Servalyt 6-8, 0,2% Servalyt 2-4, 0,5% β-Mercaptoethanol

Überschichtungslösung: 0,55% Harnstoff, 0,56% Servalyt 3-10, 0,16% Servalyt 6-8, 0,08% Servalyt 2-4

Anodenpuffer: 10 mM ortho-Phosphorsäure in ddH₂O

Kathodenpuffer: 20 mM Natriumhydroxid in ddH₂O

Agaroselösung: 2,5% Sammelgelpuffer, 2 mg Bromphenolblau, 0,2g Agarose

Die zweidimensionale Polyacrylamidgel Elektrophorese (2D-PAGE) Methode wurde als „non-equilibrium-pH-gel electrophoresis“ (NEpHGE) durchgeführt. In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung in Rundgelen, erfolgte die Trennung der proteasomalen Untereinheiten aufgrund ihres isoelektrischen Punktes (pI). In der zweiten Dimension, einer SDS-Gelelektrophorese, wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Die mit Ethanol gefällten Proben (siehe 2.2.1.6) wurden in 10 µl Harnstoffprobenpuffer aufgenommen und auf Harnstoffrundgele mit einem Durchmesser von 0,2 cm und einer Länge von 7 cm aufgetragen und mit Übersichtungslösung bedeckt. Nach Auffüllen der Kammer mit Anoden- und Kathodenpuffer wurde die Elektrophorese 3 h bei 400 V unter Kühlung durchgeführt. Nach der Isoelektrischen Fokussierung wurden die Gele mit einer Injektionspritze aus den Röhrchen gedrückt und nach kurzem Spülen in ddH₂O auf ein SDS Polyacrylamidgel übertragen und dort in Agaroselösung gebettet. Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde wie unter 2.2.1.8 durchgeführt. Die Gele wurden im Anschluss entweder mit Coomassie gefärbt oder per Western Blot weiter analysiert (siehe 2.2.1.9).

2.2.1.13 Proteolytische Prozessierung von synthetischen Peptiden *in vitro*

Stopplösung: 3% TFA in ddH₂O

Die *in vitro* Prozessierungen von Polypeptid-Substraten durch gereinigte 20S Proteasomen wurden mit den Polypeptiden GP100₄₀₋₅₂, GP100₃₅₋₅₇ und GP100₂₀₁₋₂₃₀, die aus der Sequenz des Melanocyten-spezifischen Proteins GP100 (Nagorsen et al., 2004) stammen, durchgeführt. Ausserdem wurde pp89₁₆₋₄₀, ein virusspezifisches Peptid aus dem murinen Cytomegalovirus (MCMV IE pp89 Protein) verwendet. 0,5 µg des 20S Proteasoms wurden in einem Volumen von 50 µl TEAD Puffer mit einer Konzentration von 40 µM des Polypeptids gemischt. Nach Inkubationszeiten von 0 - 8 h bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Stopplösung sowie Einfrieren der Proben bei -20°C gestoppt.

2.2.1.14 Massenspektrometrischen Analyse von Prozessierungsprodukten

Laufmittel A: 0,05 % TFA in HPLC-Wasser

Laufmittel B: 70 % Acetonitril, 0,045 % TFA in HPLC-Wasser

Durch Analyse von Verdauansätzen mittels Elektronenspray Ionisierung-Massenspektrometrie (ESI-MS) ist eine Identifizierung und Quantifizierung der gebildeten Peptide möglich. Die Proben wurden mit dem Standardpeptid 9GPS versetzt und über reverse Phase HPLC (HP1100, Agilent) chromatographisch getrennt. Der Gradient aus Laufmittel A und B wurde Peptidspezifisch optimiert. Die eluierten Peptide wurden direkt in der online gekoppelten ESI-MS (LCQ, Thermo Fisher, bzw. LCQ Deca XP Max, Thermo Fisher) anhand des Masse/Ladungsverhältnisses und Fragmentierung in der Ionenfalle analysiert werden.

Die massenspektrometrischen Messungen wurden zum großen Teil von Kathrin Textoris-Taube und Christin Keller (beide Institut für Biochemie, Charité-Universitätsmedizin-Berlin) durchgeführt.

2.2.1.15 Proteinidentifizierung

Zur Identifizierung von 20S Proteasom-Untereinheiten wurden mit Coomassie gefärbte Proteinbanden aus dem Nativ-Gel ausgeschnitten und durch Dr. Katharina Janek und Agathe Niewianda (beide Institut für Biochemie, Charité-Universitätsmedizin-Berlin) mittels Peptidmassen-Fingerprint analysiert. Dazu wurden die Peptide tryptisch verdaut und die resultierenden Peptide wurden mittels MALDI_TOF/TOF (4700 Proteomics Analyzer, APPLIED BIOSYSTEMS) gemessen.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung von Hepatocyten

Medium: DMEM , 4,5 g/l Glucose, 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ 10.000 µg/ml), 1% (v/v) 200 mM L-Glutamin

Zellen wurden in Medium bei 37 °C unter 5 % CO₂ Atmosphärenkonzentration kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen umgesetzt oder geerntet. Für die Ernte wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in Medium aufgenommen. Nach 5 min Zentrifugation bei 1000 rpm wurden die Überstände von den Pellets entfernt. Nach Waschen der Zellen in PBS erfolgte erneute Zentrifugation und Abnahme des Überstandes. Die Zellen wurden bis zur Verwendung bei – 20°C gelagert.

2.2.2.2 Isolierung von 20S Proteasomen aus HuH-7

Zellpellets wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit TEAD Puffer versetzt. Durch wiederholtes Einfrieren der Proben in Stickstoff und Auftauen bei 37 °C (Frier-Tau) wurden Zellen aufgeschlossen. Zellhomogenate wurden zusätzlich durch Ultraschallbehandlung weiter aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden bei 14.000 rpm für 60 min bei 4 °C abzentrifugiert. Es folgte der Auftrag der Probe auf eine DEAE-Toyopearl Säule (FPLC) mit Gelvolumen 20 ml, äquibriert in TEAD Puffer. Durch Anlegen eines Gradienten von 0 auf 500 mM NaCl in TEAD wurden Proteine von der Säule eluiert und in 100 Fraktionen à 2 ml gesammelt. Die 20S Proteasomen enthaltenden Fraktionen wurden identifiziert und vereint. Die weitere Präparation der 20S Proteasomen erfolgte mittels Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltration wie unter 2.2.1.1 beschrieben.

2.2.3 Analytische Methoden

2.2.3.1 Statistische Analysen

Angegeben wurden Mittelwerte \pm SEM (*standard error of the mean*), welche mit dem Programm SigmaStat 3.0 ermittelt wurden. Statistische Signifikanzen beobachteter Unterschiede der Mittelwerte wurden mit dem „Student’s T-test“ bzw. mit dem „Mann-Whitney Rank-Sum Test“ (wenn der Student’s T-test nicht durchführbar war) überprüft.

2.2.3.2 Ermittlung von Intensitäten in Gelen mittels Pixelzahlen

Zur Quantifizierung und zum Vergleich der Proteasom- und anderer Proteinbanden nach Substrat-Overlays, Coomassiefärbungen und Western Blots wurden densitometrische Analysen mittels des Programms ImageJ durchgeführt. Normalisierung der Intensitäten erfolgte für die Proteasomaktivitäts-Overlays durch densitometrische Auswertung mehrerer sichtbarer Proteinbanden nach Coomassiefärbung der Gele. Für die Normalisierung der Signalstärken von Immununtereinheiten nach Coomassiefärbung und Western Blot wurden die Intensitäten von Signalen zu Grunde gelegt, die nicht austauschbaren proteasomalen Untereinheiten zugeordnet werden konnten.

2.2.3.3 Quantifizierung von Spalt-Peptiden im Verdau mit 20S Proteasom

Mit Hilfe des Programms Sequest wurden von Kathrin Textoris-Taube und Christin Keller Schnittkarten der Fragmente aus den Polypeptid-Substraten erstellt, die bei den Prozessierungen dieser Peptide mit verschiedenen 20S Proteasomen gebildet wurden. Anhand dieser Schnittkarten, die auch die Massen (m/z) und die Retentionszeiten der Fragmente auflisten, konnten mit Hilfe des Programms LCQuan gezielt die Bildungskinetiken und Mengen bestimmter Peptide analysiert werden. Dabei stellt die Integration des detektierten Signals eine Maß für die relative Menge des Verdauproduktes dar. Normalisierung erfolgte mit Hilfe des Modellpeptids 9GPS. Nach

dem Exportieren der Integrationen nach Excel mit dem Programm Extraktor-B6 spiegeln die graphischen Darstellungen der relativen Intensitäten über die Zeit (Dauer des Verdaus) die Bildungskinetiken der Verdauprodukte wider.

Die Auswertungen wurden z.T. von Kathrin Textoris-Taube und Christin Keller durchgeführt.

2.2.3.4 Ermittlung von Mengen gebildeter Peptidfragmente und Ermittlung von Schnitthäufigkeiten der 20S Proteasomen

Die Analysen der Mengen gebildeter Fragmente bei Peptidverdau sowie das Erstellen der Schnitthäufigkeitskarten wurden mittels der QME-Methode von Dr. M. Mishto durchgeführt. Die verwendeten Programme wurden von Dr. A. Goede generiert (Mishto et al., 2012).

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung von Rohextrakten aus Rattenleber verschiedener Altersstufen

Bereits in früheren Untersuchungen wurden 20S Proteasomen aus Rattenleber gereingt und charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass fünf verschiedene 20S Proteasom-Subtypen isoliert werden konnten (Dahlmann et al., 2000), die unterschiedliche Untereinheitenkonfiguration und unterschiedliche proteolytische Aktivitäten zeigten (Schmidt et al., 2006). Dabei handelte es sich hauptsächlich um 20S Proteasomen des intermediären Typs, die zugleich Standard- und Immununtereinheiten enthielten. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich die Proteinmenge, die Untereinheitenkonfiguration und die proteolytische Aktivität von Leber-20S Proteasomen im Alterungsprozess verändern.

3.1.1 Proteingehalt und proteolytische Aktivität

Die biochemische Charakterisierung von 20S Proteasomen aus Rattenleber begann mit der Herstellung von Leber-Rohextrakten durch Homogenisation des Gewebes in Puffer und anschließender Zentrifugation zur Abtrennung unlöslichen Materials, sowie der Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Messung zeigte, dass die Proteinkonzentration mit zunehmendem Alter abnahm, so dass sie im Alter von 23 Monaten (23 Mo) mit 94,7 mg Protein/g Leber nur noch ca. zwei Drittel der Menge der 2 Monate (2 Mo) alten Tiere (134,4 mg/g) entsprach (Abb. 1A).

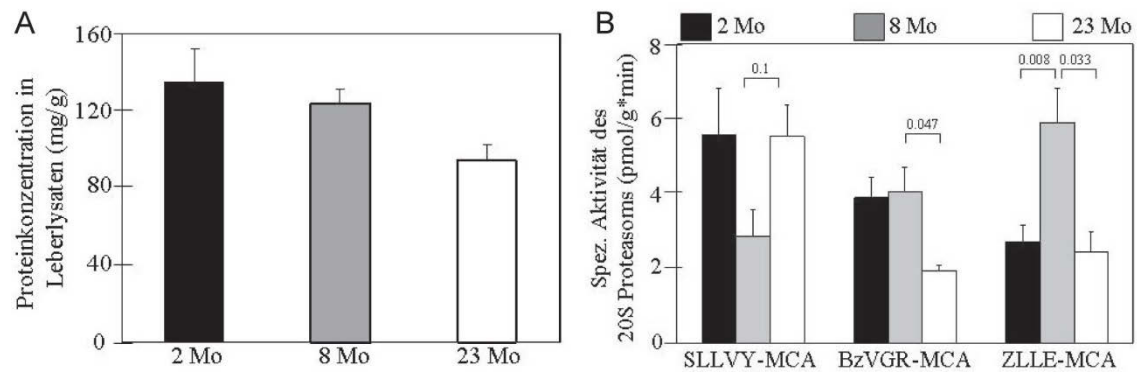


Abb.1: Bestimmung der Proteinkonzentration in Leber-Rohextrakten der Altersstufen 2 Monate (2 Mo), 8 Monate (8 Mo) und 23 Monate (23 Mo). Die mittels Bradford bestimmte Proteinmenge wurde auf die Gewebemenge bezogen (A)

Bestimmung der spezifischen proteasomalen Aktivitäten (pmol/mg*min) in Leber-Rohextrakten von Ratten verschiedener Altersstufen mittels der Substrate SLLVY-MCA (chymotryptisch), BzVGR-MCA (tryptisch) und ZLLE-MCA (caspaseähnlich), B. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Extrakten pro Altersstufe. P-Werte (t-Test) zum Vergleich der Mittel sind angegeben.

Die spezifischen proteasomalen Aktivitäten wurden mittels kurzer fluorogener Peptidsubstrate in den Rohextrakten verschiedener Altersstufen bestimmt und verglichen (Abb. 1B). Im Vergleich zu den anderen Altersstufen war die chymotryptische Aktivität (SLLVY-MCA) bei 8 Monate (8 Mo) alten Tieren am niedrigsten. Die trypsinähnliche Aktivität (BzVGR-MCA) war in Leberlysaten 23 Mo alter Tiere signifikant niedriger ($p=0,047$), die caspaseähnliche Aktivität in 8 Mo alten Ratten signifikant erhöht ($p=0,008$ und $0,003$), jeweils gegenüber den beiden anderen untersuchten Altersstufen.

Auch das Verhältnis der drei proteasomalen Aktivitäten zueinander unterschied sich innerhalb jeder Altersstufe. Bei den 2 Mo alten Tieren wurden absteigende Werte von der chymotryptischen, über die tryptische, hin zur caspaseähnlichen Aktivität (chymotryptisch > tryptisch > caspaseähnlich; schwarze Balken, Abb. 1B) gemessen. Dieses Ergebnis entsprach in etwa den Beobachtungen in 23 Mo alten Tieren (weiße Balken Abb. 1B), wobei sich die Werte für die tryptische und die caspaseähnliche Aktivität in etwa entsprachen (chymotryptisch > tryptisch \approx caspaseähnlich). Für das Gewebe 8 Mo alter Tiere zeigte sich jedoch ein gegenläufiges Verhältnis (chymotryptisch < tryptisch < caspaseähnlich; graue Balken, Abb. 1B).

3.1.2 Aktivitätsbestimmung der Proteasom-Komplexe in Lysaten durch Substrat-Overlay

Die in Kapitel 3.1.1 ermittelten Aktivitäten sind nicht Proteasom-spezifisch, da die verwendeten Substrate auch von anderen proteolytischen Enzymen, die in Gewebeextrakten vorhanden sind, abgebaut werden. Um einen etwas präziseren Überblick über mögliche altersabhängige Aktivitätsveränderungen des Proteasoms zu erhalten, wurden je vier Gewebeextrakt-Proben aus vier verschiedenen Rattenlebern jeder Altersstufe (Proben A – D) durch Nativ-PAGE aufgetrennt. Durch Substrat-Overlay mit SLLVY-MCA, wurde die proteasomale chymotryptische Aktivität bestimmt. Mit anschließender Coomassiefärbung wurde die Pixelzahl von drei verschiedenen Protein-Banden bestimmt und als Ladekontrolle für die densitometrische Analyse herangezogen (Abb.2b, Anhang Abb. 2).

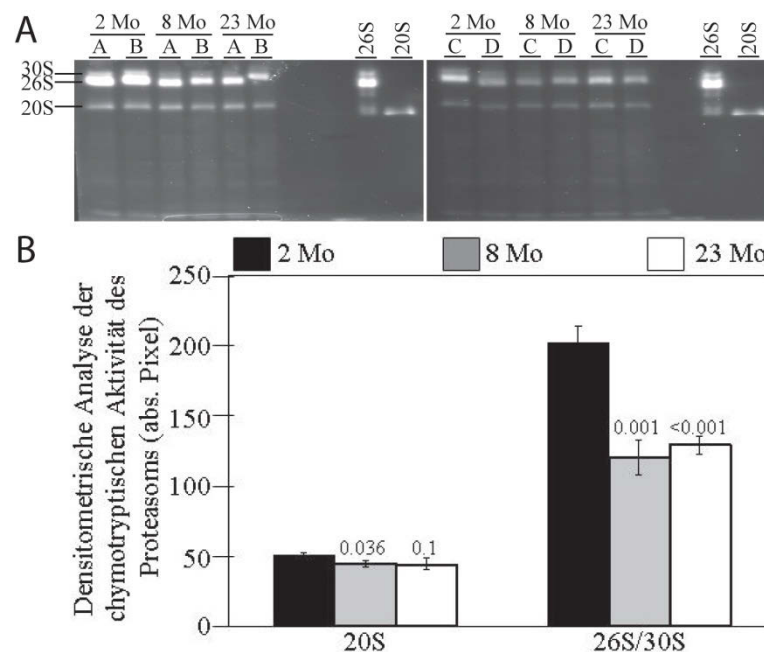


Abb. 2: Detektion der chymotryptischen Aktivität von 26S und 20S Proteasomen in Leber-Rohextrakten von 2, 8 und 23 Mo alten Ratten. Von allen Proben wurde die gleiche Proteinmenge aufgetragen. A-D bezeichnen je vier verschiedene Tiere der drei Altersgruppen. 5 µg von gereinigtem 20S und 26S Proteasom wurde als Kontrolle eingesetzt. Die Gele wurden mit dem fluorogenen Substrat SLLVY-MCA (chymotryptische Aktivität) inkubiert. Im Anschluss wurde die Fluoreszenz mittels UV-Illumination detektiert (A). Die densitometrische Analyse wurde mit ImageJ durchgeführt (B). Die gleichmäßige Ladung der Proben bezüglich der Proteinmenge wurde mittels Coomassiefärbung des Gels sowie densitometrischer Analyse der Bandenintensität nachgewiesen (Anhang Abb. 2). Es sind die Mittelwerte ± SEM für je vier Proben pro Alterstufe angegeben. P-Werte für den Vergleich (t-Test) zwischen 2Mo und 8 Mo bzw. 23 Mo sind angegeben.

Es ist deutlich zu erkennen, dass das 26S/30S Proteasom der 2 Mo alten Tiere chymotryptisch am aktivsten ist (Abb. 2A, obere Banden). Die hydrolytische Aktivität der 20S Proteasomen unterschied sich nicht in den drei Altersstufen. Demnach bestätigte die Analyse zwar die Abnahme der chymotryptischen Aktivität in Lebergewebe 8 Mo alter im Vergleich zu 2 Mo alten Ratten, der erneute Anstieg in den 23 Mo alten Tieren war in der Nativgel-Analyse allerdings nicht festzustellen und könnte somit auf nicht-proteasomale Aktivität zurückzuführen zu sein.

3.1.3 Bestimmung der Summe des Gesamt-20S-Proteasom-Gehalts in Rohextrakten

Um neben der Gesamt-Proteinkonzentration in den Gewebeeextrakten auch die Proteasom-Konzentration zu kennen, wurde diese durch Rocket-Immunelektrophorese quantitativ bestimmt. Dazu wurden 20S Proteasomen als Kernkomplexe aller Proteasomen-Formen (26S/30S, Hybrindproteasomen, etc.) durch Dissoziation dieser Proteasom-Komplexe mittels Dialyse der Rohextrakte gegen TEAD Puffer freigesetzt. In der sich anschließenden Rocket-Elektrophorese konnte die Proteasomen-Menge anhand der Höhe der Immun-Präzipitate (Rockets, Abb. 3A) und einer Standardkurve (Standardkurve im Anhang Abb. A2), ermittelt werden (Abb. 3B).

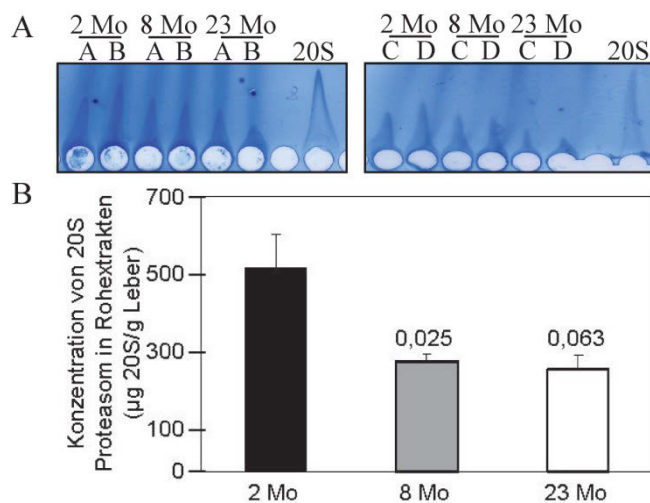


Abb.3: 10 µl der Gewebe-Rohextrakte, mit gleicher Proteinkonzentration, wurden auf Rocket-Gele aufgetragen. A-D bezeichnen jeweils vier verschiedene Tiere jeder Altersstufe. Nach erfolgter Immunelektrophorese, wurde die genaue Peakhöhe der Präzipitate (Rockets) gemessen (A), und mittels einer Eichkurve (Anhang, Abb.A2) die Gesamt-Proteasom-Mengen in den Rohextrakten der verschiedenen Altersstufen berechnet (B). Daten sind Mittelwerte \pm SEM. P-Werte (Students t-Test) für den Vergleich von 2 Mo mit 8 und 23 Mo sind angegeben.

In den Leberrohextrakten 2 Mo alter Tiere wurden 519 μg Proteasom pro g Leber gemessen. Eine signifikant niedrigere Proteasomen-Menge von 283 $\mu\text{g/g}$ wurde in den Leberproben der 8 Mo alten Tiere, sowie auch in in den Leberrohextrakten 23 Mo alter Ratten mit 260 $\mu\text{g/g}$ bestimmt. Altersabhängig verringert sich somit die Konzentration an Proteasomen im Gewebe. Auf der anderen Seite zeigten die Aktivitätsveränderungen keine alterabhängig kontinuierliche Abnahme, sondern eher biphasische Veränderungen.

Deshalb sollten in folgenden Experimenten mögliche Veränderungen der Untereinheitenzusammensetzung der Proteasom-Komplexe untersucht werden.

3.1.4 Quantifizierung der proteasomalen Standard- und Immununtereinheiten in Leberextrakten

Mittels spezifischer Antikörper gegen die Standard-Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 5$ sowie die Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ wurde der Gehalt der proteasomalen Untereinheiten in Gewebeproben aus vier Lebern jeder Altersstufe (A-D) bestimmt (Abb. 4A). Die densitometrische Auswertung durch Messung der Pixelzahlen (ImageJ) der austauschbaren Untereinheiten wurde normalisiert auf die Werte der nicht austauschbaren Untereinheit $\alpha 1$ (Abb.4B).

Im Vergleich zu den Alterstufen 2 Mo und 8 Mo war im Alter von 23 Mo eine signifikante Abnahme der Standarduntereinheit $\beta 1$ zu erkennen (Abb.4B), während sich der Gehalt der proteasomalen Untereinheit $\beta 5$ in den drei Altersstufen nicht änderte (Abb. 4B). Hinsichtlich der beiden Immununtereinheiten wurden in Lebergewebe der 8 Mo alten Tiere signifikant niedrigere Mengen im Vergleich zu 2 Mo und 23 Mo gemessen (Abb. 4B)

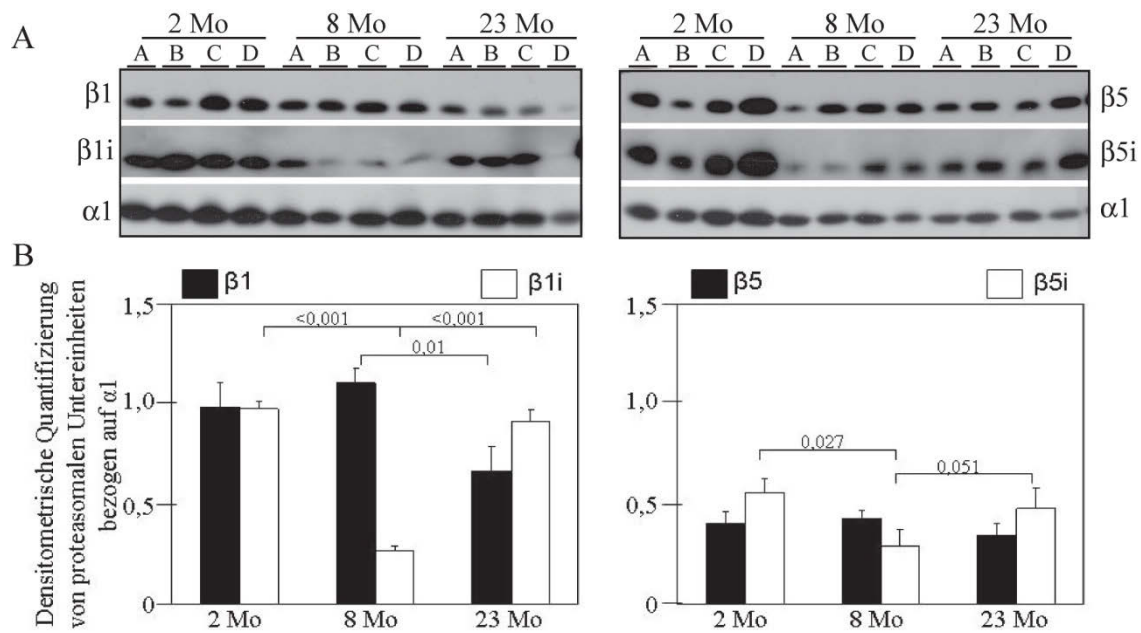


Abb. 4: Analyse der Untereinheitenzusammensetzung von Proteasomen in Rohextrakten von Rattenlebern: Es wurden 10µg der Rohextrakte auf 12,5% SDS Gele aufgetragen, geblotet und im Anschluss mit Antikörpern gegen die Proteasomuntereinheiten β1i, β5i, β1 und β5 inkubiert (A). Es sind deutliche Unterschiede der Bandenintensitäten zwischen den Altersstufen zu erkennen. (B) Densitometrische Quantifizierung der Untereinheiten mit Bezug auf die nicht austauschbare Untereinheit α1. P-Werte (Students t-Test) sind für den Vergleich der drei Altersstufen angegeben.

Alle bisherigen Untersuchungen wurden in Extrakten von Lebergewebe durchgeführt. Da die proteasomale Aktivität auch durch im Rohextrakt vorhandene Proteine, die mit 20S Proteasomen interagieren, beeinflusst werden kann und Gewebeextrakte auch Biogenese-Vorstufen sowie nicht eingebaute Proteasomen-Untereinheiten enthalten können, lassen diese Untersuchungen noch keine genauen Schlüsse auf Veränderungen der Proteasomen an sich zu. Aus dem Grund sollte im Weiteren eine genaue Analyse möglicher altersabhängiger Veränderungen des Proteasoms nach seiner vollständigen Isolation und Reinigung erfolgen.

3.2 Reinigung von 20S Proteasomen aus Rattenleber verschiedener Altersstufen

Obwohl die Untersuchungen mittels Nativgel-Elektrophorese altersabhängige Aktivitätsveränderungen des 26S Proteasoms erkennen ließen, beschränkten sich nachfolgende Experimente ausschließlich auf das 20S Proteasom, da dieses in allen Proteasomen-Formen den proteolytisch aktiven Teil darstellt. Ziel dieser Arbeit war es, die Eigenschaften und Veränderungen dieser Kernkomplexe zu untersuchen.

3.2.1 Trennung von Subpopulationen

20S Proteasomen wurden durch hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) in Subpopulationen getrennt. Die Subpopulationen waren im Proteinprofil (gemessen bei 280nm) als separate Peaks zu erkennen (Abb. 5A). Um die entsprechenden aktiven Fraktionen zu vereinen, wurde die proteasomale chymotryptische Aktivität in den Fraktionen bestimmt (Abb.5B). Das Aktivitätsspektrum zeigte den Ausschlägen im Proteinprofil entsprechend drei Maxima (Abb. 5B; beschriftet mit I, II und III). Die jeweiligen Fraktionen wurden zu Subpopulation I-III (Sub I-III) vereint.

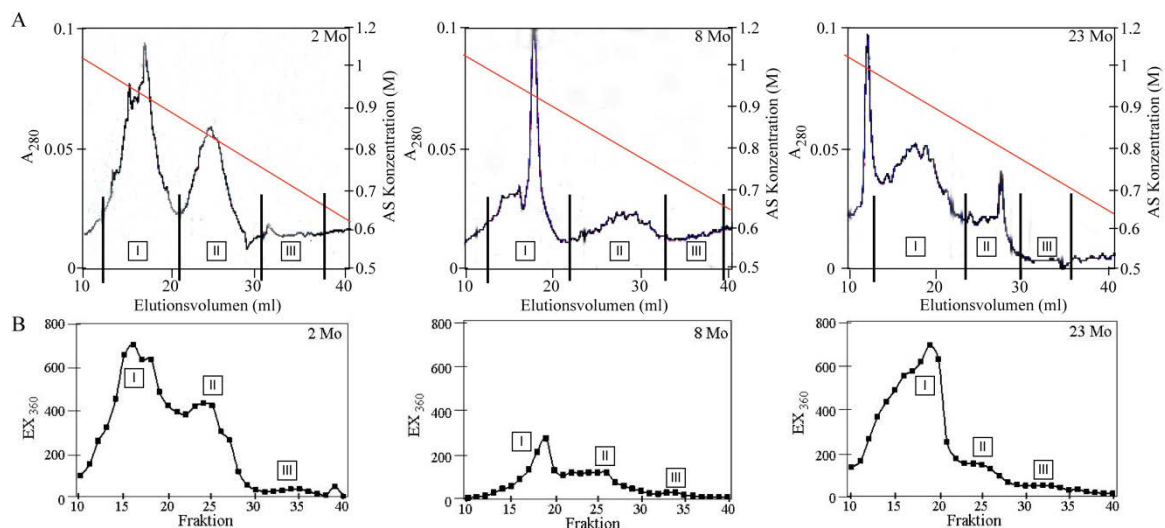


Abb.5: Trennung von Proteasom Subpopulationen mittels unterschiedlicher Hydrophobizität (A). Im letzten Schritt der Reinigung können Proteasom-Subpopulationen deutlich voneinander getrennt werden. Vereinigung der entsprechenden Fraktionen nach Messung der chymotryptischen Aktivität (B).

Die Kontrolle des Reinheitsgrades der drei Subpopulationen (Sub I – III) wurde mittels SDS-PAGE durchgeführt. Nach Coomassiefärbung des Gels zeigte sich in allen Subpopulationen das komplette typische Proteinbandenmuster für das 20S Proteasom (Abb. 6). Der Reinheitsgrad von Sub I und II war sehr hoch. Sub III enthielt neben den Untereinheiten des 20S Proteasoms auch höhermolekulare Proteine, möglicherweise 19S Regulator Untereinheiten, die an Sub III gebunden und während der Reinigung nicht abdissoziiert sind.

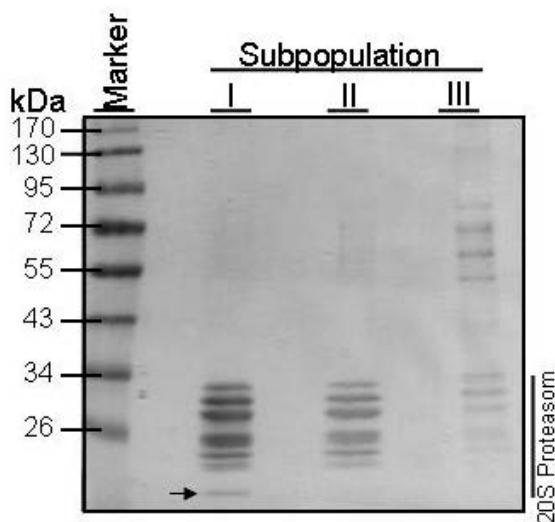


Abb. 6: Analyse der Proteasom-Subpopulationen aus Lebern 8 Mo alter Tiere durch SDS-Gelelektrophorese. 5 µg der Subpopulationen wurden auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen und anschließend mit Coomassie gefärbt. In allen Subpopulationen konnte 20S Proteasom nachgewiesen werden. Subpopulation I und II wiesen einen hohen Reinheitsgrad auf, Sub III zeigte Verunreinigungen durch hochmolekulare Fremdproteine. Die abgesetzte Proteinbande von 23 kDa (Abb. 6, Pfeil) in Subpopulation I deutet auf die Präsenz von β 1i hin.

3.2.2 Menge und Aktivität der Proteasom-Subpopulationen aus Leber von Ratten verschiedener Alterstufen

Im ersten Schritt der Charakterisierung der Subpopulationen wurde deren Menge pro g Lebergewebe bestimmt (Abb. 7). Während eine geringe, nicht signifikante Abnahme der Sub I von 0,08 mg pro g Leber (2 Monate) auf 0,06 mg/g (23 Monate) gemessen wurde, nahm die Konzentration von Sub II mit steigendem Alter stetig und signifikant ab. Eine deutliche altersabhängige Verringerung konnte auch für Sub III gezeigt werden.

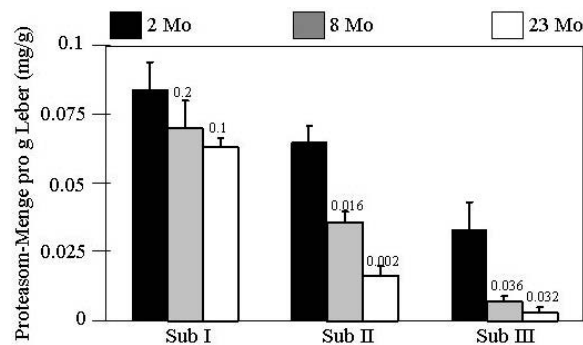


Abb.7: Bestimmungen der gereinigten Proteasomen Subpopulationen (mg Protein) bezogen auf die Gesamtgewebemenge (g) die für die Präparation eingesetzt wurde. Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Präparationen. P-Werte (Students t-Test) für den Vergleich der 2 Mo mit 8 bzw. 23 Mo sind angegeben.

Die höchsten Werte für die spezifische chymotryptische Aktivität wurden in Sub I der 2 Mo und 23 Mo alten Tiere gemessen (Abb. 8A). In allen Subpopulationen der 8 Mo alten Ratten war diese Aktivität die niedrigste.

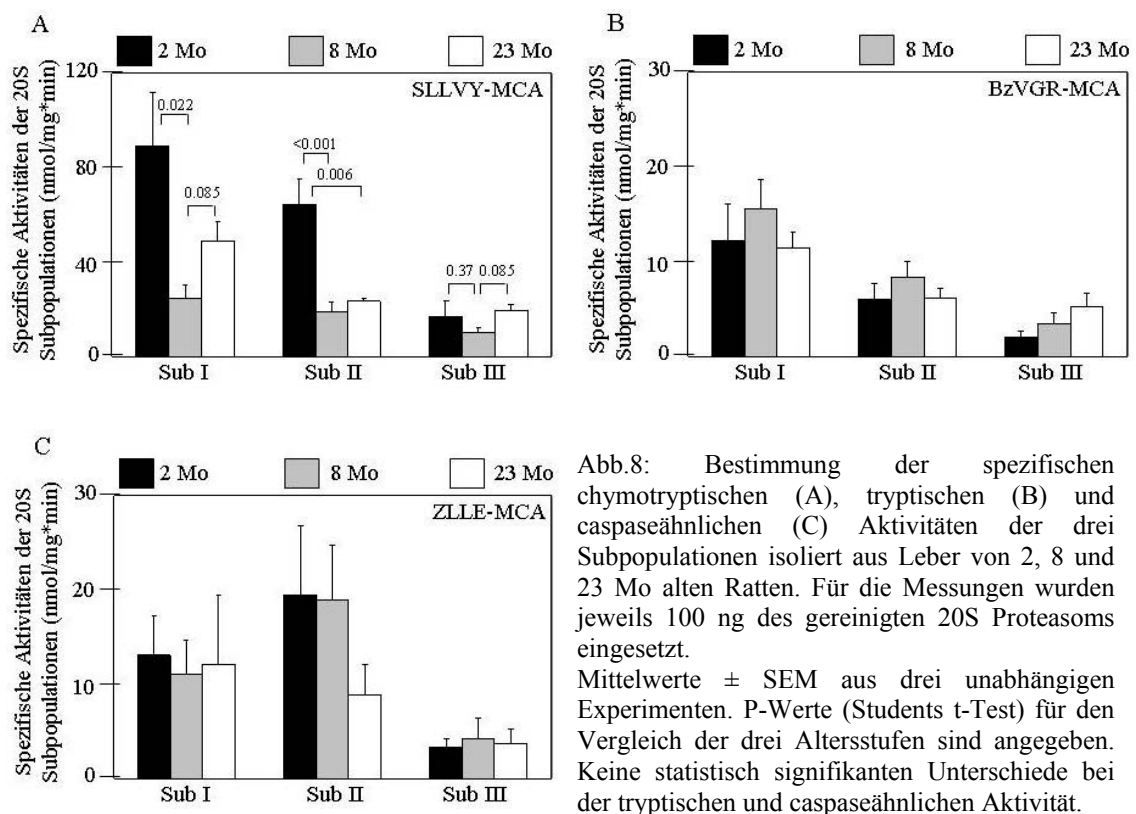


Abb.8: Bestimmung der spezifischen chymotryptischen (A), tryptischen (B) und caspaseähnlichen (C) Aktivitäten der drei Subpopulationen isoliert aus Leber von 2, 8 und 23 Mo alten Ratten. Für die Messungen wurden jeweils 100 ng des gereinigten 20S Proteasoms eingesetzt.

Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. P-Werte (Students t-Test) für den Vergleich der drei Altersstufen sind angegeben. Keine statistisch signifikanten Unterschiede bei der tryptischen und caspaseähnlichen Aktivität.

Im Fall der spezifischen proteasomalen tryptischen (Abb. 8B) und caspaseähnlichen (Abb. 8C) Aktivitäten wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt. Es zeigte sich jedoch tendenziell, dass die tryptische Aktivität der Sub I und II in 8 Mo alten Ratten jeweils die höchste war. Für die caspaseähnliche Aktivität konnte eine Abnahme der Intensitäten von jung nach alt für Sub II verzeichnet werden.

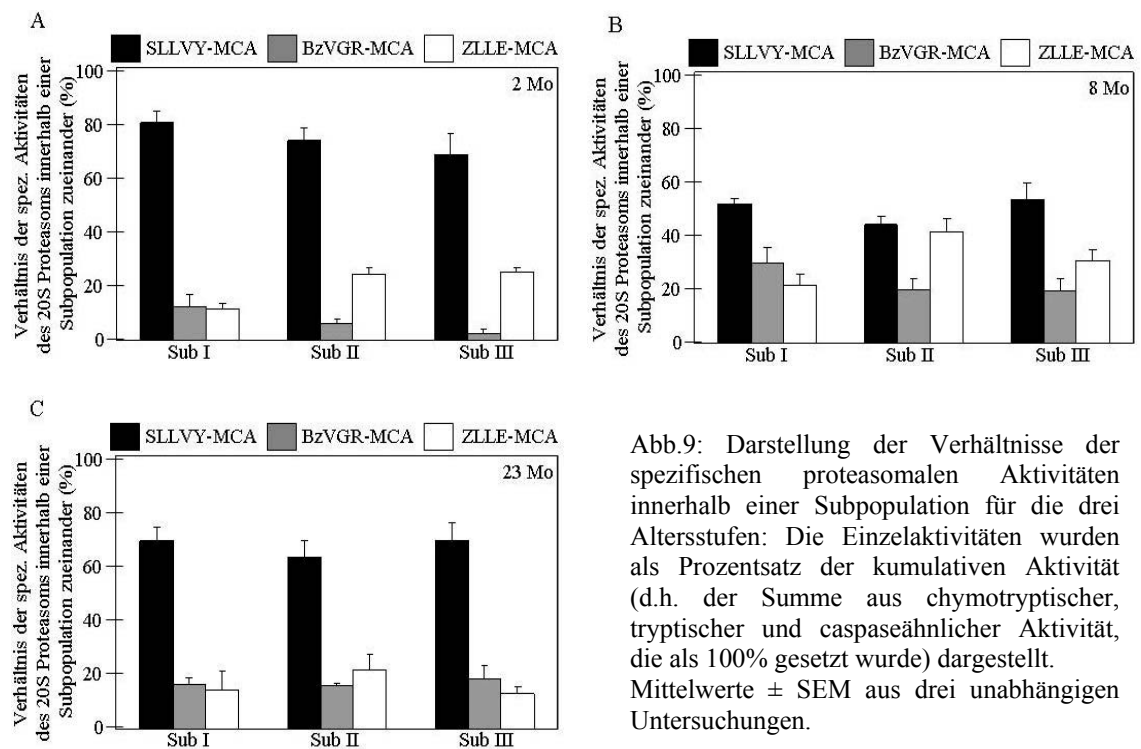


Abb.9: Darstellung der Verhältnisse der spezifischen proteasomalen Aktivitäten innerhalb einer Subpopulation für die drei Altersstufen: Die Einzelaktivitäten wurden als Prozentsatz der kumulativen Aktivität (d.h. der Summe aus chymotryptischer, tryptischer und caspaseähnlicher Aktivität, die als 100% gesetzt wurde) dargestellt. Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Untersuchungen.

Durch Addition der Einzelwerte der drei spezifischen Aktivitäten wurde die Gesamtaktivität (kumulative Aktivität) jeder Subpopulation ermittelt. Dieser Wert wurde auf 100% gesetzt. Das prozentuale Verhältnis der Höhe von chymotryptischer, tryptischer und caspaseähnlicher Aktivität wurde dargestellt. Die chymotryptische Aktivität aller Subpopulationen bei jung und alt machte dabei einen Anteil von 62 – 79 % aus (Abb. 9A und C, schwarze Balken). Im Alter von 8 Mo zeigte sich jedoch eine andere Verteilung. Durch die hohe tryptische und caspaseähnliche Aktivität machte die chymotryptische Aktivität nur einen Anteil von 51% in Sub I, 44% in Sub II und 53% in Sub III aus. Konsistent über alle Altersstufen war, dass die caspaseähnliche Aktivität der Subpopulation II im Vergleich zu Sub I immer am höchsten war.

Die Veränderungen der spezifischen proteasomalen Aktivitäten zwischen Subpopulationen, auch in Hinblick auf den Alterungsprozess, ließen eine Veränderung der Untereinheitenkonfiguration der 20S Proteasomen vermuten, die in folgenden Experimenten analysiert wurde.

3.2.3 Untereinheiten-Analyse der Proteasom-Subpopulationen aus Leber von Ratten verschiedener Altersstufen

Durch Substrat-Overlay (SLLVY-MCA) nach Trennung der Subpopulationen mittels Nativ-PAGE konnten keine unterschiedlichen chymotryptischen Aktivitäten zwischen Sub I und II festgestellt werden (Abb. 10A). Der Nachweis, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde durch Coomassiefärbung erbracht (Abb. 10A). Aufgrund der geringen Proteinkonzentration in Sub III konnte nur sehr wenig Proteasom auf das Gel aufgetragen werden. Das hat zur Folge, dass die chymotryptische Aktivität dieser Subpopulation nicht mit den anderen verglichen werden konnte. Auffällig war jedoch, dass eine Doppelbande des Proteasoms in Proben der 2 Mo und 8 Mo alten Tieren detektiert wurde. Möglicherweise führt die Assoziation der hochmolekularen Proteine, die in der SDS-PAGE (Abb. 6) nachweisbar sind, zu dieser höhermolekularen Proteasom-Form (Abb. 10A).

Um nachzuweisen, dass alle Subpopulationen aus 20S Proteasom-Komplexen bestanden, wurden die Antikörper „Serum 37“ (anti Rattenmuskel 20S Proteasom, reagiert mit mehreren 20S Proteasom-Untereinheiten) und MCP72 (Hendil et al., 1995) gegen die Untereinheit $\alpha 7$ verwendet (Abb. 10B). Obwohl gezeigt werden konnte, dass alle Subpopulationen aus Proteasomen-Komplexen bestehen, wurde offensichtlich, dass die Konzentration der 20S Proteasomen in Sub III der verschiedenen Altersstufen geringer war als mittels Bradford Messung bestimmt. Ausserdem konnte in dieser Probe wie im Substrat-Overlay eine Doppelbande in Höhe von 680 kDa nachgewiesen werden (Sub III 2 und 8 Mo), die beide 20S Proteasomen enthielten. Die Wanderungsgeschwindigkeit der oberen Bande deutete auf die Präsenz eines Komplexes des 20S Proteasoms mit Proteasom-Aktivator PA28 oder auch einzelner Untereinheiten des 19S Regulators hin. Dies konnte allerdings mittels Immunblot nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

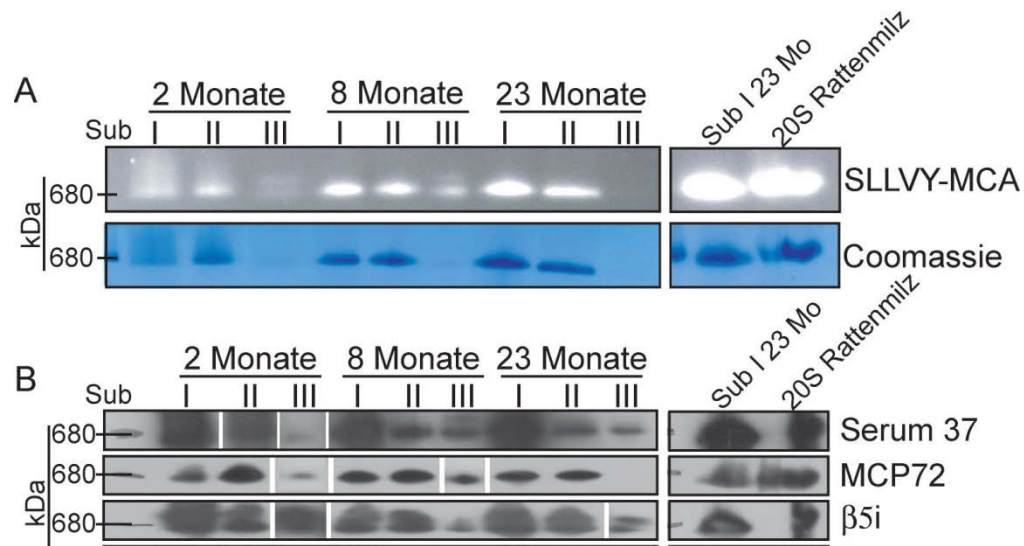


Abb. 10: Analyse von gereinigten Subpopulationen mittels Nativ-Gelelektrophorese (A) und Western Blot (B). 2 µg 20S Proteasomen wurden auf Nativgelen elektrophoriert und mit dem chymotryptischen fluorogenen Substrat SLLVY-MCA untersucht (A). Im Anschluss wurde das Gel Coomassie gefärbt. Für den Western Blot wurde 1 µg 20S Proteasom pro Spur auf ein Nativ-Gel aufgetragen. Detektion von 20S Proteasom erfolgte mit den Antikörpern Serum 37 (anti Rattenmuskel 20S Proteasom) und MCP72 (anti α7, B). Als Kontroll-20S Proteasom wurde gereinigtes 20S Proteasom aus Rattenmilz verwendet, dessen Laufeigenschaften mit 20S Proteasom der Sub I 23 Mo alter Ratten verglichen wurde.

Zur Identifikation der proteasomalen Untereinheiten in den 20S Proteasom-Komplexen wurden die mit Coomassie angefärbten Banden der Größe von ca. 700 kDa (Subpopulation I-III) aus dem Nativgel ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau per MALDI TOF analysiert.

Alle identifizierten Untereinheiten wurden in Tab. 1 aufgeführt. Die schwarzen Kreuze symbolisieren die Untereinheiten, die eindeutig identifiziert werden konnten (≥ 3 Peptide identifiziert), die roten zeigen diejenigen Untereinheiten an, bei denen nur 1-2 Peptide identifiziert werden konnten, so dass diese als „Kandidaten“ galten. Bis auf β1i in Sub III konnten alle proteasomalen

Tab. 1: Identifikation von proteasomalen Untereinheiten in 20S Proteasom Sub I-III (Näheres siehe Text)

	Sub I	Sub II	Sub III
α1	X	X	X
α2	X	X	X
α3	X	X	X
α4	X	X	X
α5	X	X	X
α6	X	X	X
α7	X	X	X
β1	X	X	X
β2	X	X	X
β3	X	X	X
β4	X	X	X
β5	X	X	X
β6	X	X	X
β7	X	X	X
β1i	X	X	X
β2i	X	X	---
β5i	X	X	X

Untereinheiten in jeder Subpopulation identifiziert werden. Während in Sub I und II

keine Verunreinigungen durch andere Proteine nachgewiesen wurden, wurden in Sub III neben Cytoskelettbestandteilen und ribosomalen Proteinen auch Bestandteile des 19S Regulators gefunden, was die Beobachtungen der Analyse von Subpopulationen mittels SDS-PAGE (Abb. 6) und Nativ-PAGE (Abb. 10) bezüglich der Identität der langsam wandernden Proteinbande bestätigte.

Um die Mengen der austauschbaren Untereinheiten in den Subpopulationen zu quantifizieren, wurden die proteasomalen Untereinheiten der Sub I-III mittels 2D-PAGE aufgetrennt. Da die meisten Proteinspots einer 2D-PAGE von Rattenleber bereits analysiert worden sind (Schmidt et al., 2006), konnten anhand dieser Referenz alle nachgewiesenen Proteinspots den entsprechenden Proteasom-Untereinheiten zugeordnet werden. Zusätzlich wurden die Spots der Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ sowie die Standarduntereinheiten $\beta 5$ und $\beta 1$ mittels Analyse durch 2D Immuno-Blot (siehe Anhang, Abb. A3) identifiziert.

In allen Subpopulationen wurden die Untereinheiten $\alpha 1 - \alpha 7$, $\beta 1 - \beta 7$ sowie auch die Immununtereinheit $\beta 5i$ nachgewiesen. Einigen Untereinheiten lagen als Isoformen vor. Deswegen konnten ihnen mehrere Proteinspots zugeordnet werden. Im Gegensatz zu der massenspektrometrischen Analyse der Proben wurde die Untereinheit $\beta 1i$ eindeutig nur in Sub I der drei Altersstufen nachgewiesen. Entsprechend war der Anteil der Standarduntereinheit $\beta 1$ in dieser Subpopulation niedriger als in Sub II und III (schwächere Färbung der Proteinspots, Abb. 11). Obwohl $\beta 5i$ mehr oder weniger in allen Subpopulationen aller Altersstufen nachweisbar war, war der Anteil in Sub I am höchsten. Entsprechend war die homologe Standarduntereinheit $\beta 5$ eindeutig in Sub I der 8 Mo alten Tiere sowie in den Sub II und III nachweisbar.

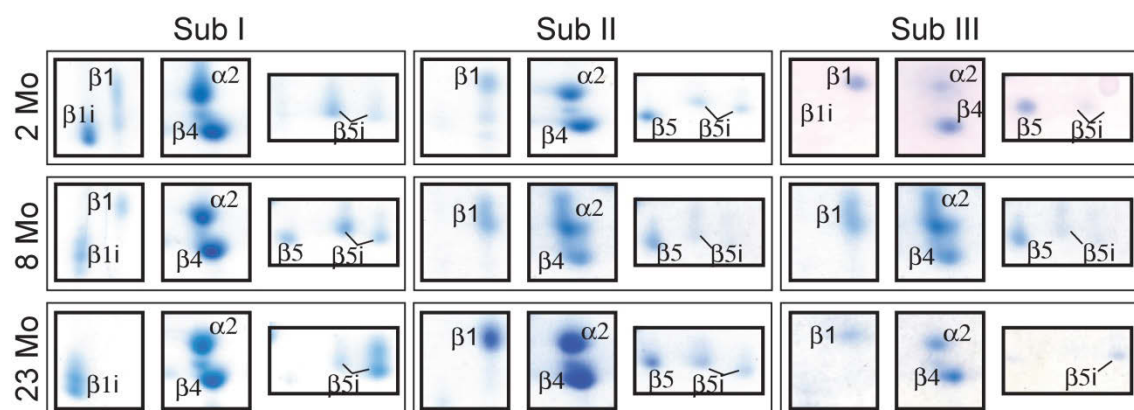


Abb. 11: Analyse der Untereinheitenzusammensetzung der Proteasomen Subpopulationen verschiedener Altersstufen: 25 μ g gereinigtes 20S Proteasom von Subpopulation I-III der 2, 8 und 23 Mo alten Ratten wurden mittels 2D-PAGE aufgetrennt. Die Zuordnung der Spots erfolgte anhand des Referenzgels (Schmidt et al., 2006). Gezeigt sind hier nur die Ausschnitte der Gele mit den angegebenen Untereinheiten.

Die nicht austauschbaren Untereinheiten $\beta 2$ und $\beta 4$ sollten bei gleichmäßiger Ladung in allen untersuchten Proben in gleichem Maß vorhanden sein. Mit Coomassie konnten einige Untereinheiten jedoch nur schlecht angefärbt werden. Dies traf auch auf die Untereinheit $\alpha 2$ und $\beta 4$ zu. Diese Untereinheiten müssen in gleichen Mengen im Proteasom-Zylinder integriert sein, da es sich nicht um austauschbare Untereinheiten handelt. Die Färbeintensitäten dieser Untereinheiten variierten jedoch, was eine Normalisierung der Menge austauschbarer Untereinheiten mit den Mengen der nicht austauschbaren Untereinheiten ungenau machen würde. Dennoch war anhand der austauschbaren Untereinheiten eine Dynamik bezogen auf den Alterungsprozess zu erkennen. Mit steigendem Alter wurde vor allem in Sub I vermehrt $\beta 5i$ und gleichzeitig weniger $\beta 5$ ins Proteasom eingebaut.

Die Immununtereinheit $\beta 1i$ war nur in Sub I aller Altersstufen nachweisbar. Es schien eine transiente Abnahme der Menge dieser Untereinheit im Alter von 8 Mo zu geben. Gleichzeitig war die nachweisbare Menge der homologen Standarduntereinheit $\beta 1$ in Sub II und III deutlich höher als in Sub I. Dieses Ergebnis widersprach den Daten der Massenspektrometrie, bei denen auch in Sub II $\beta 1i$ nachgewiesen werden konnte. Die Identifizierung von $\beta 1i$ mittels Massenspektrometrie für Sub II war mit lediglich drei identifizierten Peptiden und Sequenzübereinstimmung von 17% jedoch sehr unsicher (nicht gezeigt). Es wäre denkbar, dass die sehr geringen Mengen der integrierten Untereinheit $\beta 1i$ in Sub II mittels der 2D-Analyse nicht detektierbar waren. In Sub III waren die Änderungen inhomogen, was auf die niedrigen Färbeintensitäten der Proteasomen-Untereinheiten Spots zurückzuführen war.

Zur Verifizierung der beobachteten altersabhängigen Veränderungen wurden die Proteasomen auch mittels Immuno-Blot nach eindimensionaler SDS-PAGE analysiert. Zur densitometrischen Normalisierung wurde Bezug genommen auf die Menge der nicht austauschbaren Untereinheit $\alpha 7$, die mit dem monoklonalen Antikörper MCP72 bestimmt wurde (Abb. 12). In Sub I wurde eine leichte altersabhängige Zunahme von $\beta 5i$ und transiente (8 Mo) Abnahme an $\beta 1i$ nachgewiesen. Untereinheit $\beta 1i$ war auch mit dieser Methode nur in Sub I nachweisbar.

Diese Daten bestätigten die mittels 2D-PAGE ermittelten Unterschiede der Untereinheitenzusammensetzung von Proteasom-Subpopulationen. Demnach handelte es sich bei allen drei Subpopulationen um Intermediärproteasomen (enthalten sowohl Standard- als auch Immununtereinheiten). Sub I enthielt neben $\beta 5i$ auch einen hohen

Anteil an $\beta 1i$, während Sub II kein $\beta 1i$ (oder nur einen sehr geringen Anteil) enthielt. Der Anteil der Standard-Untereinheiten war in Sub II deutlich höher als in Sub I (nicht gezeigt).

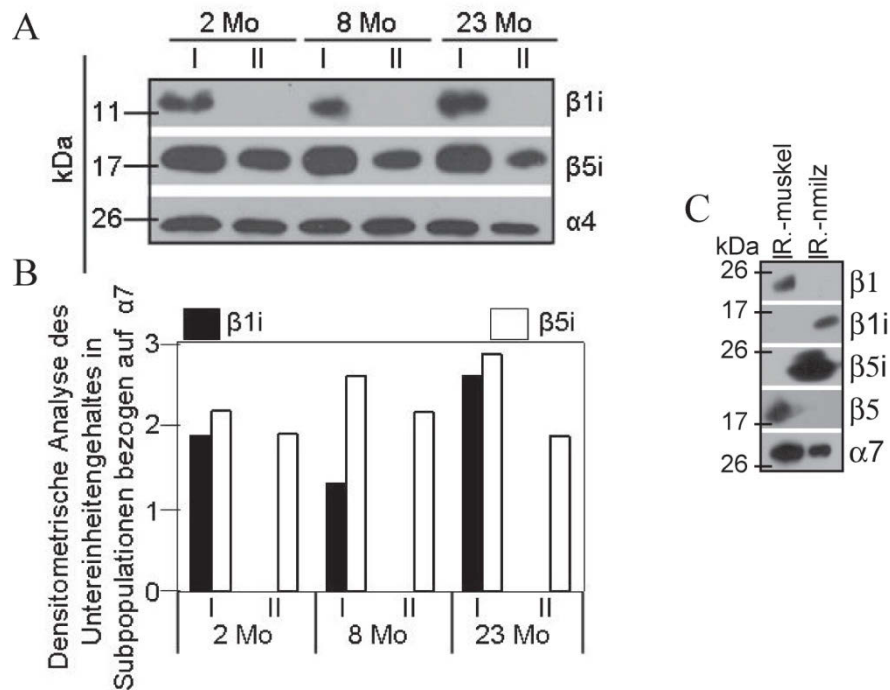


Abb. 12: 1D Analyse der Untereinheitenzusammensetzung von Proteasom-Subpopulationen der drei Altersstufen: 500 ng Protein wurden nach SDS-PAGE auf PVDF Membranen geblottet und die Untereinheiten $\beta 1i$, $\beta 5i$, $\beta 5$ und $\beta 1$ wurden mit Antikörpern detektiert. Als Ladekontrolle wurden die Blots mit dem monoklonalen Antikörper MCP72 (anti $\alpha 7$) behandelt. Die unterschiedliche Verteilung der Immuno- bzw. Standarduntereinheiten wurde sowohl in Subpopulationen I und II (A) nachgewiesen und densitometrisch analysiert (B). Die Spezifität der Antikörper konnte anhand von Immunoblots mit 20S Proteasomen aus Rattenskelettmuskel (Standardproteasomen) und Rattenmilz (Immunoproteasomen) gezeigt werden (C).

In Sub III wurde ebenfalls kein $\beta 1i$ nachgewiesen, sondern nur $\beta 5i$ und die Standard-Untereinheiten (nicht gezeigt). Die in Sub I im Alter von 8 Mo auftretende Verringerung der Immununtereinheit $\beta 1i$ entsprach den Beobachtungen, die mittels 2D-PAGE gemacht worden sind.

3.2.4 Vergleichender Polypeptidabbau zur Analyse der proteolytischen Aktivitäten der Subpopulationen aus Ratten verschiedener Alterstufen

Welche Auswirkung die unterschiedliche Untereinheitenzusammensetzung auf die proteolytischen Eigenschaften der 20S Proteasom hatten, sollte durch die Hydrolyse synthetischer Polypeptidsubstrate analysiert werden. Über einen Zeitraum von 8 Stunden wurden die Subpopulationen I-III mit Peptidsubstraten verschiedener Längen inkubiert, die Teilsequenzen des Melanocyten-spezifischen Proteins GP100 (Abb. 13A) waren (Vigneron et al., 2004). Desweiteren wurde der Abbau des bereits gut untersuchten 25mer-Peptids (pp89₁₆₋₄₀) aus dem murinen Cytomegalovirus (MCMV) IE pp89 Protein untersucht (Abb. 13B).

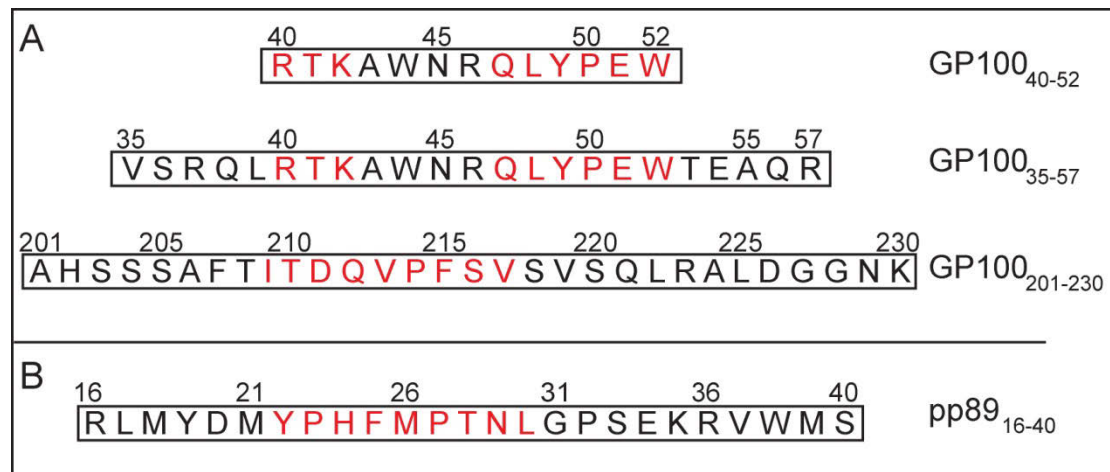


Abb. 13: Sequenzen der verwendeten Peptide für kinetische Analysen der proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms: Die Peptide GP100₄₀₋₅₂, GP100₃₅₋₅₇ und GP100₂₀₁₋₂₃₀ stammen aus dem Melanocyten-spezifischen Protein GP100^{PMEL17}, pp89₁₆₋₄₀ ist ein 25mer aus MCMV IE pp89 Protein. Rot markierte Peptide in GP100₄₀₋₅₂ und GP100₃₅₋₅₇ werden vom Proteasomen generiert; im Fall der Peptide GP100₂₀₁₋₂₃₀ und pp89₁₆₋₄₀ sind die immunodominanten Epitope rot markiert.

Der Abbau der Substrate wurde mittels HPLC-ESI zeitabhängig gemessen und zu jedem gemessenen Zeitpunkt die Menge des verbleibenden Substrates als prozentualer Anteil am Nullwert dargestellt (Abb. 14 und 15).

Verwendet wurden die Polypeptide GP100₄₀₋₅₂ und das N- und C-terminal verlängerte GP100₃₅₋₅₇. Das dritte Peptid, GP100₂₀₁₋₂₃₀, stammt aus einem anderen Bereich des parentalen Proteins.

Analysiert man die Hydrolyseraten von Polypeptiden durch Proteasomen, so werden die Zeitwerte verglichen, bei denen 50% des Substrates abgebaut waren (50%

Substratabbau = $t/2$). Man geht davon aus, dass bis zu diesem Zeitpunkt die Substrate durch initiale Schnitte abgebaut wurden. Über $t/2$ hinaus kommt es vermehrt zum Wiedereintritt bereits entstandener Spalt-Peptide ins Proteasom, was die Substratabbaukinetik verändert.

Bei der Hydrolyse des 13mers GP100₄₀₋₅₂ durch Sub I und II der Altersstufen 2, 8 und 23 Mo konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich $t/2$ detektiert werden (Abb. 14A), dennoch schien das kurze Substrat durch Sub I mit $t/2$ von 180-240 min etwas besser hydrolysiert zu werden als durch Sub II ($t/2$ = 240-360 min). Bei Hydrolyse von GP100₄₀₋₅₂ durch Sub III wurde $t/2$ auch nach 480 min Inkubation nur mit Proteasomen aus 23 Mo alten Tieren erreicht. Im Vergleich zu den Ergebnissen mit Sub I und II zeigte Sub III generell eine geringere Abbau-Effizienz für dieses Substrat.

Ein ähnliches Ergebnis wurde bei Hydrolyse des 23mer GP100₃₅₋₅₇ erzielt. Mit Sub I, II und III aller Altersstufen wurde $t/2$ maximal nach 240 min Inkubation erreicht. Obwohl dieser Wert mit Sub I und III 8 Mo alter Ratten bereits nach 60 min erreicht war, ließen sich aufgrund der großen Standardabweichungen keine statistischen Signifikanzen darstellen.

Bei Verwendung des Substrates GP100₂₀₁₋₂₃₀ wurden im Gegensatz zu den vorangegangenen Experimenten für die verschiedenen Subpopulationen signifikante Unterschiede bezüglich der Hydrolysegeschwindigkeit gemessen. Die Subpopulationen 23 Mo alter Ratten bauten GP100₂₀₁₋₂₃₀ am schnellsten ab. Bereits nach 120 (mit Sub I und II) bzw. 180 min (Sub III; Abb. 14C) war $t/2$ erreicht. Die gleiche Menge des Substrates wurde mit Subpopulationen aus 8 Mo alten Tieren erst 120 min (Sub I) bzw. 300 min (Sub III) später hydrolysiert. Alle drei Subpopulationen aus 2 Mo alten Ratten erreichten $t/2$ im gemessenen Zeitraum nicht (Abb. 14C).

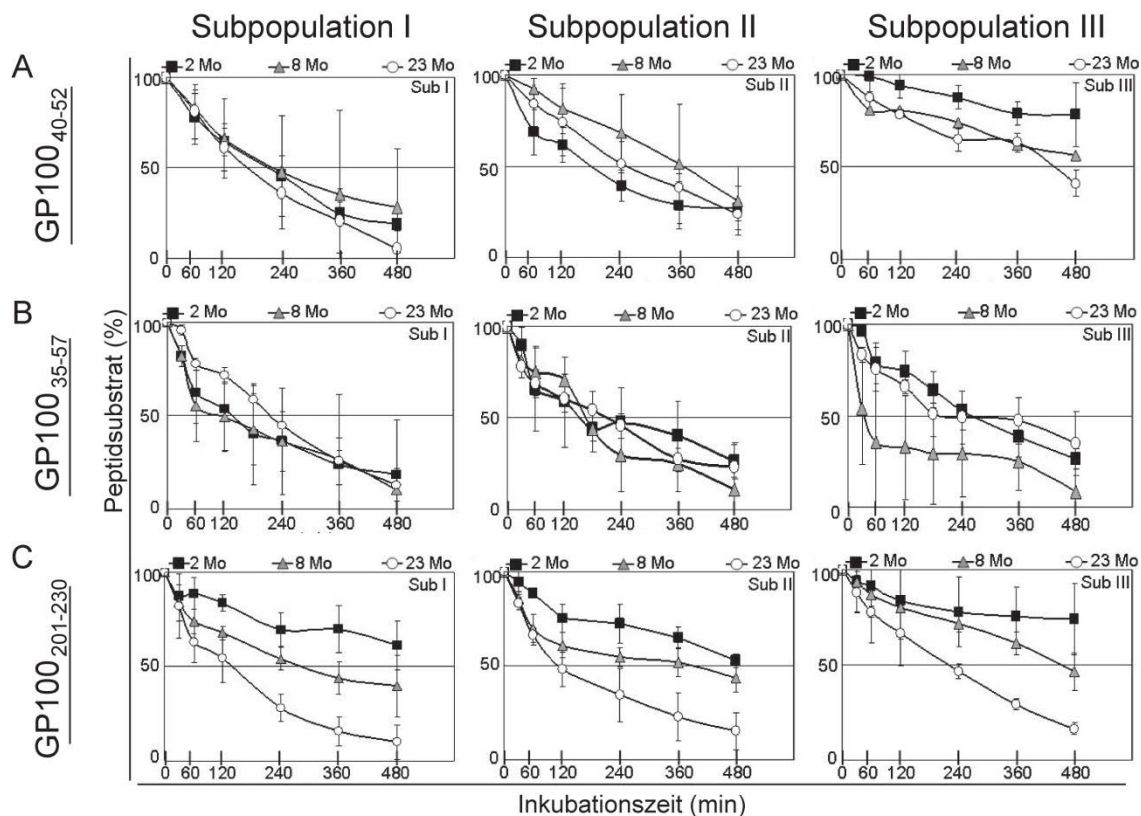


Abb.14: Abbau von Polypeptidsubstraten durch 20S Proteasomen der Sub I, II und III gereinigt aus Lebern von 2, 8 und 23 Mo alter Ratten. 0,5 μ g 20S Proteasom wurden mit 40 μ M des Polypeptids (GP100₄₀₋₅₂, GP100₃₅₋₅₇ und GP100₂₀₁₋₂₃₀) bei 37 °C inkubiert. Hydrolyserate des Substrates wurde mittels HPLC-ESI Messung bestimmt. Auswertung der Intensitäten der Substratpeaks erfolgte mit LCQuan. Darstellung des zum jeweiligen Zeitpunkt verbliebenen Substrates als prozentualer Anteil vom Nullwert. Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Verdaus sind angegeben.

Es wurde festgestellt, dass es jedes Polypeptidsubstrat mit einer speziellen Kinetik durch 20S Proteasomen abgebaut wird. Dabei spielt die Länge des Peptids insofern eine Rolle, als in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede bei Hydrolyse kurzer Peptide bis 23 Aminosäuren durch die verschiedenen Subpopulationen gemessen werden konnten. Bei dem Verdau des 30mer GP100₂₀₁₋₂₃₀ allerdings zeigten 20S Proteasomen aus 23 Mo alten Tieren die signifikant höchste Hydrolyserate. Während sich zwischen den Subpopulationen einer Altersstufe nur schwer signifikante Unterschiede hinsichtlich der Abbaukinetiken nachweisen ließen, existierten doch große Unterschiede bezüglich der proteolytischen Eigenschaften von Proteasom-Subpopulationen aus Lebern unterschiedlich alter Ratten.

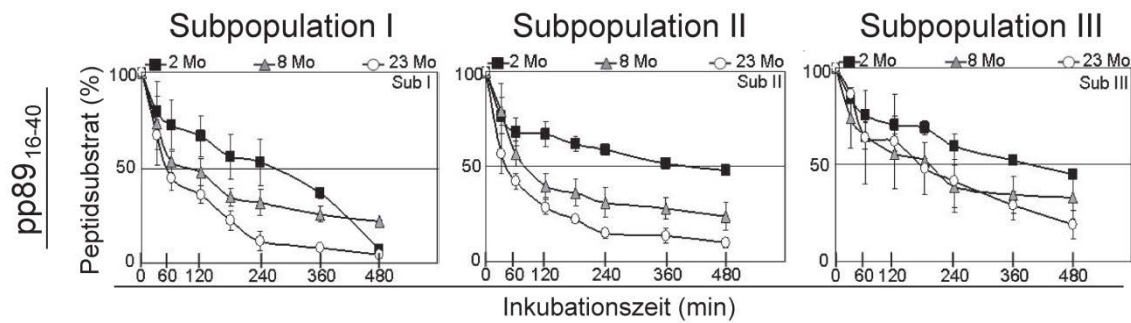


Abb.15: Abbau des Substrates pp89₁₆₋₄₀ durch 20S Proteasomen der Sub I, II und III aufgereinigt aus Lebern von 2, 8 und 23 Mo alten Ratten. Hydrolysen und Auswertungen wurden wie unter Abb. 14 erläutert durchgeführt. Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

Zur Unterstützung dieser Beobachtung wurde als viertes Peptid das 25mer pp89₁₆₋₄₀ (Abb. 15) untersucht. Auffallend war auch hier der sehr schnelle Abbau des pp89₁₆₋₄₀ durch die Subpopulationen der alten Tiere (23 Mo). Während $t/2$ mit Sub I und II bereits nach 60 min bzw. nach 180 min (Sub III) gemessen wurde, wird die gleiche Abbaurate mit Subpopulationen 2 Mo alter Ratten erst 180 min später erreicht (Abb. 15). Die Hydrolyseraten des pp89₁₆₋₄₀ durch Subpopulationen 8 Mo alter Tiere ähnelten denen der 23 Mo alten Tiere.

Auffallend bei der Betrachtung der Hydrolyseraten von pp89₁₆₋₄₀ war der schnelle Abbau des Substrates in der ersten Stunde, ein deutlicher Unterschied zum eher linearen Abbau der Tumorantigensubstrate (Abb. 14). Das lag daran, dass das pp89₁₆₋₄₀ durch einen sehr schnellen proteasomalen Schnitt initial prozessiert wurde (Peters et al., 2002), bei dem die carboxyterminale Aminosäure abgetrennt wurde (Anhang, Abb. A4). Es wurde postuliert, dass das Proteasom neben den bekannten Aktivitäten auch eine „carboxypeptidaseähnliche“ Aktivität besitzt (Löwe et al., 1995). Das Fragment pp89₁₆₋₃₉ wurde mit Subpopulationen der 8 und 23 Mo alten Tiere nach 30 bzw. 60 min Inkubation entsprechend der hohen Hydrolyserate schneller gebildet als das durch den Hauptschnitt entstehende Peptid pp89₁₆₋₃₀ (Anhang, Abb. A4). Über $t/2$ hinaus kam es vermehrt zum Wiedereintritt des initial gebildeten pp89₁₆₋₃₉ in den Proteasom-Zylinder. In Folge dessen wurde das Fragment schneller abgebaut als gebildet, die detektierbare Menge des Fragments nahm ab (Abb. A4 A). Gleichzeitig wurden sekundäre Fragmente wie z.B. pp89₁₆₋₃₀ gebildet, die in den ersten Minuten des Verdaus nur in sehr geringer Menge nachweisbar waren (Abb. A4 B). Die größte Menge des Fragments pp89₁₆₋₃₉ ließ sich mit Proteasomen der 2 Mo alten Ratten, entsprechend der langsamen Hydrolyserate, erst nach deutlich längerer Inkubation nachweisen.

Dieses Ergebnis bestätigte, dass Unterschiede in der *in vitro* Abbaurate durch verschiedene Proteasom-Subpopulationen um so eher sichtbar werden, je länger das Polypeptidsubstrat ist. Die Polypeptide GP100₂₀₁₋₂₃₀ und pp89₁₆₋₄₀ wurden durch 20S Proteasomen aus Lebern älterer Tiere wesentlich schneller abgebaut als durch Proteasomen junger Ratten.

3.3 Trennung der 20S Proteasom-Subpopulationen in ihre Proteasom-Subtypen

Aus den Untersuchungen der Proteasomen im Rattenherz (Kloss et al., 2009) ist bekannt, dass sich die drei Proteasom-Subpopulationen, die sich bezüglich der Oberflächenhydrophobizität unterscheiden, wiederum in verschiedene Subtypen mit unterschiedlicher Oberflächenladung weiter unterteilen lassen. Aus dem Grund wurden auch die Proteasom-Subpopulationen der Leber (Sub I-III) mittels Anionenaustausch-Chromatographie in Subtypen getrennt.

3.3.1 Vergleich von Proteasom-Subtypenspektren aus Leber von Ratten verschiedener Alterstufen

Die unter 3.2 untersuchten Subpopulationen wurden in Proteasom-Subtypen getrennt, die bei steigenden Ionenstärken von der Säule eluierten (Abb. 16). Für jede Subpopulation der drei Altersstufen konnten reproduzierbare Subtypen-Spektren aufgenommen werden, die sich deutlich voneinander unterschieden. Sub I der 2, 8 und 23 Mo alten Ratten ließ sich jeweils in fünf verschiedene Subtypen (I.1- I.5) trennen, deren mengenmäßige Verteilung sich während des Alterns kaum veränderte. Diese Verteilung ähnelte dem publizierten Muster von Subtypen isoliert aus Rattenleber (Dahlmann et al., 2000). In der ebenfalls aus fünf Subtypen bestehenden Sub II hingegen veränderten sich die Verhältnisse der Subtypenmengen zueinander

altersabhängig. So zeigte sich eine transiente Abnahme von Subtyp II.1 sowie die Abnahme von II.3, II.4 und II.5 bei 23 Mo alten Tieren (Abb. 16). Die Menge des Subtyps II.2 blieb konstant.

Von jeder Subpopulation wurde laut der Proteinbestimmung die gleiche Proteinmenge auf die MiniQ Säule aufgetragen. Die Absorptionswerte (A_{280}) bei Trennung von Subtypen der Sub III waren jedoch deutlich geringer (Abb. 16) als für Sub I und II. Das lag daran, dass Sub III neben 20S Proteasomen einen hohen nicht-proteasomale Proteinanteil enthielt, der bei der Chromatographie abgetrennt wurde (nicht gezeigt). Die Nettomenge gereinigter Subtypen der Sub III war somit deutlich geringer als für Sub I und II, die sich nur aus 20S Proteasom-Subtypen zusammensetzten. Das Subtypenmuster der Sub III unterschied sich deutlich von den anderen Subpopulationen. Vor allem das Spektrum der Sub III 8 Mo konnte mit keinem anderen Subtypenmuster verglichen werden. Aufgrund der geringen Proteinmengen wurden die Fraktionen zu zwei Subtypen (III.1 und III.2) vereint.

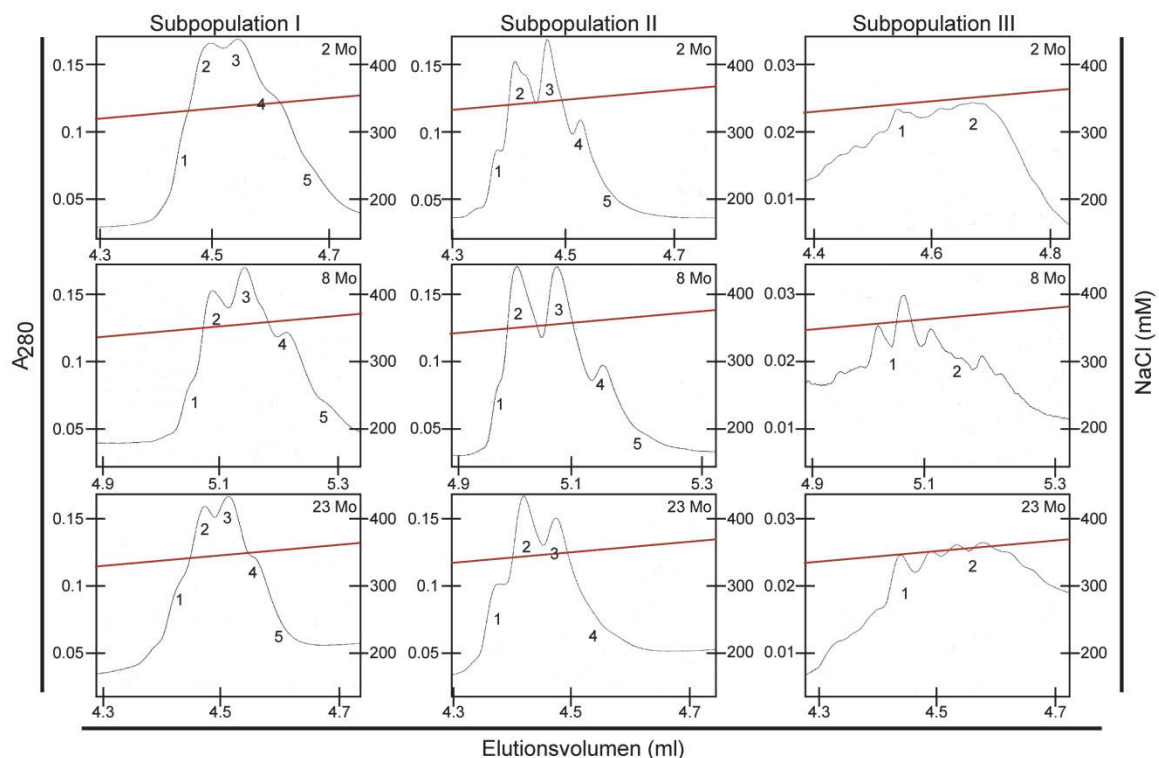


Abb. 16: Isolation von Proteasom-Subtypen.

Jeweils 25 μ g der Sub I-III der Altersstufen 2, 8 und 23 Mo wurden an einer MiniQ Säule (SMART System) mit Hilfe eines NaCl Gradienten (0 - 0,5 M) in verschiedene proteasomale Subtypen getrennt. Gezeigt ist der Ausschnitt aus dem UV-Spektrum mit einer Salzkonzentration von 320 – 370 nM NaCl, bei der die Proteasom-Subtypen eluieren.

Um Reste benachbarter Subtypen komplett abzutrennen, wurden die einzelnen Subtypen über die MiniQ rechromatographiert und dann ihre jeweilige Proteinmenge bestimmt (Tab. 2).

<i>Subtypen- Gesamtmenge (µg)</i>			
Subtypen	2 Monate	8 Monate	23 Monate
I.2 + I.3. + I.4	275	241	290
II.1. + II.2 + II.3	142	120	79
III.1 + III.2	44	48	30
Total	461	409	399

Tab. 2: Menge der isolierten Proteasom-Subtypen in Abhängigkeit vom Alter der Tiere: Zur Ermittlung der Proteasomen-Menge wurde die Proteinmengen der Einzelsubtypen I.2-I.4, II.2-II.4 sowie III.1-III.2 addiert.

Die Gesamtmenge der gereinigten Subtypen nimmt mit zunehmendem Alter der Tiere ab. Dieses Ergebnis bestätigt somit die Quantifizierungen der Proteasomen im Rohextrakt (Abb3B) und der getrennten Subpopulationen (Abb 7).

3.3.2 Vergleich der Aktivitäten der isolierten Subtypen aus Leber von Ratten verschiedener Alterstufen

Durch das Messen der spezifischen Aktivitäten der einzelnen Subtypen konnten deren unterschiedliche proteolytische Eigenschaften nachgewiesen werden (Abb. 17). Weil die Absolutwerte für die spez. Aktivitäten bei jeder Präparation sehr unterschiedlich waren, führte das in der Auswertung zu großen Standardabweichungen. Dennoch ließen sich folgende Beobachtungen festhalten:

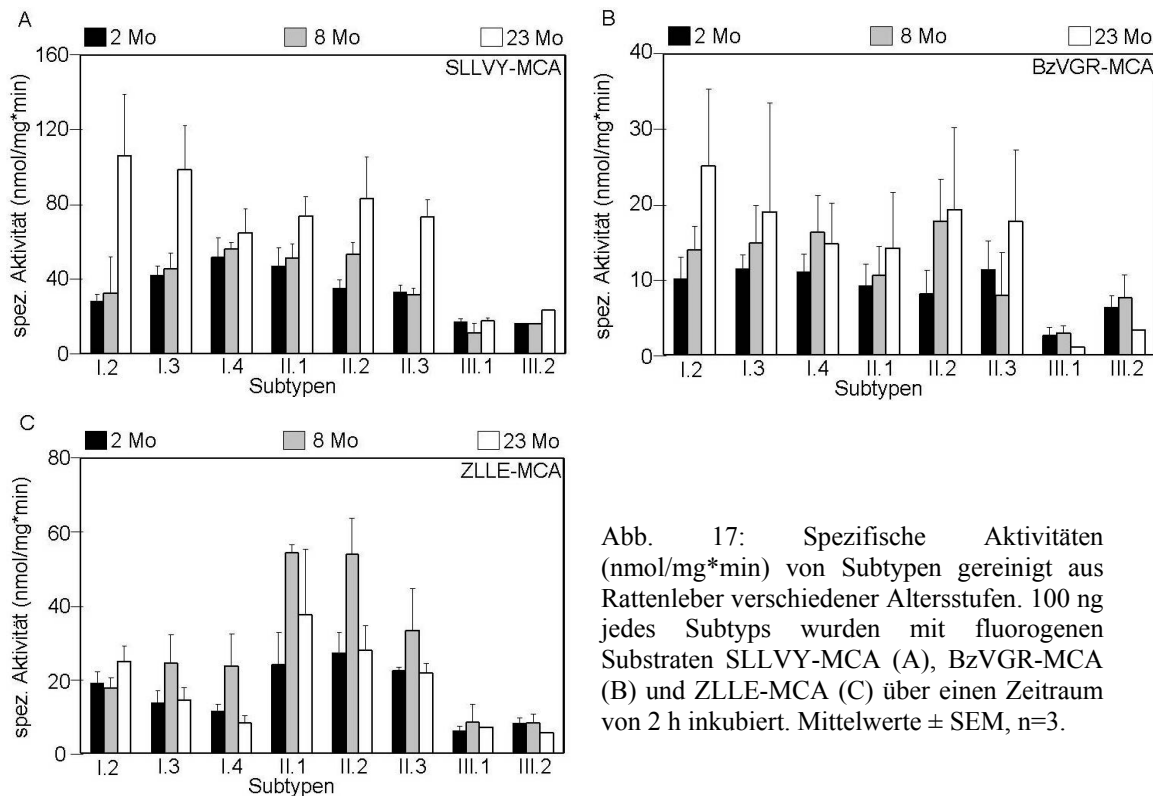


Abb. 17: Spezifische Aktivitäten (nmol/mg*min) von Subtypen gereinigt aus Rattenleber verschiedener Altersstufen. 100 ng jedes Subtyps wurden mit fluorogenen Substraten SLLVY-MCA (A), BzVGR-MCA (B) und ZLLE-MCA (C) über einen Zeitraum von 2 h inkubiert. Mittelwerte \pm SEM, n=3.

1. Die chymotryptische Aktivität (SLLVY-MCA) der Subtypen I.2 - I.4 sowie II.1 -II.3 war im Alter von 23 Mo mit 65 nmol/mg*min (Subtyp I.4) bis 106 nmol/mg*min (Subtyp I.2) deutlich höher als bei Subtypen der anderen Altersstufen, bei denen sie maximal bei 53 nmol/mg*min (Subtyp I.4 8 Mo) lag. Tendenziell galt das auch für die tryptische Aktivität (BzVGR-MCA) dieser Subtypen. Interessant war, dass die Subtypen, die die höchste chymotryptische Aktivität im Alter von 2 und 8 Mo hatten (Subtypen I.4 und II.1), nur noch eine geringe Aktivitätszunahme von 8 nach 23 Mo zeigten.
2. Hinsichtlich der Caspase-Aktivität (ZLLE-MCA) fiel auf, dass diese in den Subtypen I.3 - I.4 transient bei 8 Mo angestiegen ist. Dieses Phänomen war in den Subtypen II.1 - II.3 noch deutlicher ausgeprägt. Letztere haben die höchste Caspase-Aktivität von allen isolierten Subtypen. Diese Beobachtungen deckten sich mit den Ergebnissen der Subpopulations-Analysen aus Kapitel 3.2.3 und zum Teil mit den in den Leber-Rohextrakten erhobenen Daten.
3. Die Subtypen der Sub III wiesen grundsätzlich die niedrigsten spezifischen Aktivitäten auf. Die nicht signifikanten altersabhängigen Veränderungen in

dieser Subpopulation entsprachen nicht den Veränderungen der Subtypen aus Sub I und II.

Die Veränderungen der spezifischen Aktivitäten einzelner Subtypen (Abb. 17) entsprachen nur teilweise den Aktivitätsveränderungen in den Subpopulationen (Abb. 8) im Bezug zum Alterungsprozess. Aus diesem Grund wurde die Summe der Aktivität der gereinigten 20S Proteasomen pro g eingesetzter Leber (Gesamtaktivität) errechnet (Abb. 18). Ein Vergleich der Gesamtaktivitäten von Proteasomen im Rohextrakt (Abb. 1B) mit denen der gereinigten Subpopulationen und Subtypen (Abb. 18A und B) macht nur begrenzt Sinn, da die Aktivität im Rohextrakt auf der Gesamtheit von 26S und 20S Proteasomen inklusive eventuell vorhandener Regulatoren (PA28, PA200) beruht. Im Gegensatz dazu waren in den Subpopulationen und Subtypen nur hochgereinigte 20S Proteasomen vorhanden. Dennoch war interessant zu sehen, dass die Summen für jede der drei Aktivitäten sowohl bei Bestimmung der Subpopulationen (Abb. 18 A) als auch der Subtypen (Abb. 18 B) ähnliche Muster zeigten wie in den Rohextrakten (Abb. 1B). Somit ließen sich folgende Veränderungen der proteasomalen Aktivitäten in Subpopulationen und Subtypen im Alterungsprozess festhalten:

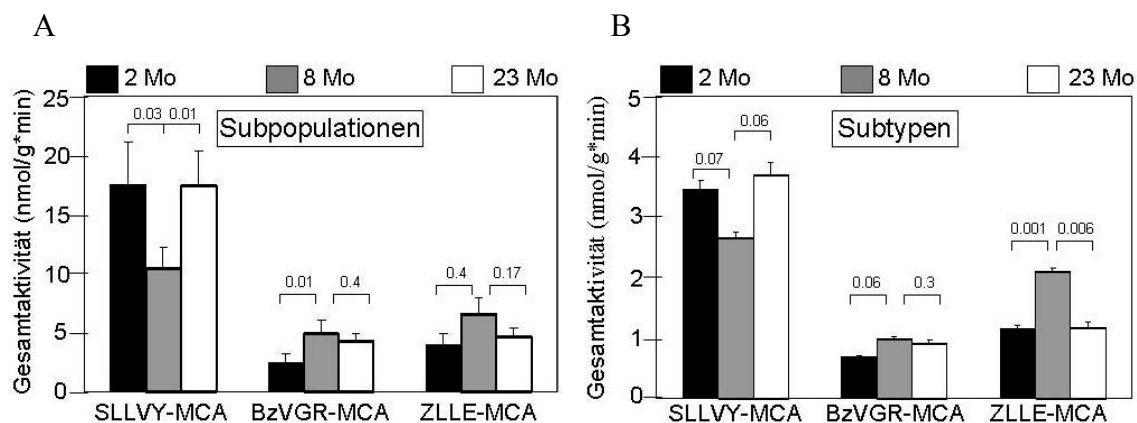


Abb. 18: Gesamtaktivitäten von Proteasomen aus Ratten verschiedener Alterstufen nach ihrer Trennung in Subpopulationen (A) und Subtypen (B). Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD. P-Werte (Student's t-Test) für den Vergleich der drei Altersstufen sind angegeben.

Die Mengen der Subpopulationen und Subtypen verringerten sich im Alter von 8 Mo so, dass die 20S Proteasomen dieser Altersklasse trotz höherer spezifischer Einzelaktivitäten die signifikant niedrigste chymotryptische Gesamtaktivität (SLLVY-

MCA) zeigten (Abb. 18 A und B). Für die 2 Mo und 23 Mo Ratten wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der chymotryptischen Gesamtaktivität gemessen. Anders verhielt es sich hinsichtlich der tryptischen Gesamtaktivität (BzVGR-MCA). Sub I und II sowie deren Subtypen (8 Mo) waren tryptisch so aktiv, dass die Mengenabnahme mehr als kompensiert wurde und die höchste Gesamtaktivität zur Folge hatte. Mit steigendem Alter veränderten sich die Werte für die tryptische Gesamtaktivität kaum noch (Abb. 18A und B).

Für die caspaseähnliche Gesamtaktivität (ZLLE-MCA) der Subpopulationen ließen sich keine statistisch signifikanten Änderungen feststellen (Abb. 18A). Andererseits reichte der transiente Anstieg der spezifischen caspaseähnlichen Aktivität der Subtypen im Alter von 8 Mo aus, um trotz des Mengenverlusts an Proteasomen eine erhöhte Gesamtaktivität zu zeigen (Abb. 18B). Tendenziell zeigte sich dies auch bei den Subpopulationen (Abb 18A) und bereits bei den Messungen im Rohextrakt (Abb. 1B).

3.3.3 Analyse der Untereinheitenzusammensetzung der Proteasom-Subtypen

Nachdem die Zusammensetzung der Proteasom-Subpopulationen hinsichtlich ihrer Standard- und Immununtereinheiten bekannt war, stellte sich die Frage, ob und inwieweit sich die Subtypen hinsichtlich ihres Gehaltes an Standard- und Immununtereinheiten ebenfalls unterschieden.

Mittels 2D-PAGE wurden die Subtypen I.4 und II.1 verglichen. In Subtyp I.4 konnten die Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$, sowie mit geringem Anteil auch die Standarduntereinheiten $\beta 1$ und $\beta 5$, nachgewiesen werden (Anhang, Abb. A5), was der Untereinheitenverteilung der Subpopulation entsprach (Abb. 11). Subtyp II.1 zeigte das typische Untereinheitenmuster der Sub II mit dem hohen Anteil an $\beta 1$. Eine detaillierte Analyse nach dieser Methode würde eine vergleichende 2D-PAGE aller Subtypen erfordern, wofür die Menge der präparierten Subtypen jedoch nicht ausreichte. Deshalb wurden die Hauptsubtypen I.2-I.4 und II.1-II.3 mittels Immunoblot nach SDS-PAGE untersucht (Abb. 19).

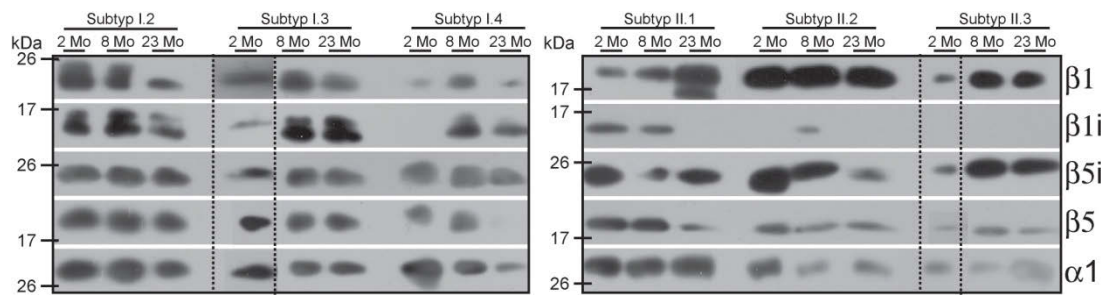


Abb. 19: 1D Analyse von Subtypen der drei Subpopulationen. 0,5 µg jedes Subtyps wurde durch SDS-PAGE getrennt und auf den Gehalt der Standarduntereinheiten $\beta 5$ und $\beta 1$, sowie Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ mittels Immunoblot getestet. Die gestrichelten Linien markieren Ausschnitte aus länger entwickelten Filmen zur Detektion der Proteinbanden.

Wie in Abb. 19 zu erkennen, war aufgrund von Transferproblemen der Nachweis der $\alpha 1$ -Untereinheit nicht durchgängig gleich gut gelungen. Um dennoch einen Einblick in den Gehalt der austauschbaren β -Untereinheiten in den Subtypen I.2 – II.1 zu erhalten, wurden die Mengen dieser Untereinheiten mittels densitometrischer Analysen auf den Gehalt von $\alpha 1$ normalisiert (Abb. 20). Für die Subtypen II.2 und II.3 wurden anhand der Intensitäten der Banden austauschbarer Untereinheiten im Vergleich mit Subtypen der Sub I deutliche Unterschiede sichtbar.

Auch ohne die Normalisierung konnte festgestellt werden, dass von Subtyp II.1 bis II.3 der an sich schon kaum detektierbare Gehalt an $\beta 1i$ abnahm. Die zunehmend negative Oberflächenladung der Subtypen einer Subpopulation, die ihre Trennung am Anionenaustauscher ermöglichte, konnte nicht allein auf einen veränderten Gehalt an Immununtereinheiten zurückgeführt werden.

Hinsichtlich des Vergleichs der Subtypen der drei Subpopulationen zeigte sich das gleiche Bild wie in der Subpopulations-Analyse (3.2). Die Subtypen I.2 – I.4 enthielten im Vergleich zu den Subtyp II.1 (Abb. 20A), sowie auch zu II.2 und II.3 (Abb. 19), entsprechend ihres hohen Gehalts an Immununtereinheiten weniger Standarduntereinheiten (Abb. 20B). Die Subtypen aller Subpopulationen können somit als Intermediärproteasomen bezeichnet werden. Subtypen der Sub I enthielten sowohl $\beta 5i$ als auch $\beta 1i$, was vermutlich zu ihrer erhöhten chymotryptischen Aktivität führte. Die Subtypen der Sub II hingegen enthielten zwar $\beta 5i$ aber kaum $\beta 1i$, dafür aber einen höheren Gehalt der Standarduntereinheiten $\beta 5$ und $\beta 1$. Diese Untereinheitenkonfiguration könnte möglicherweise die höhere caspaseähnliche Aktivität erklären (3.3.2, Abb.17) (Aki et al., 1994; Driscoll et al., 1993; Gaczynska et al., 1996; Gaczynska et al., 1994).

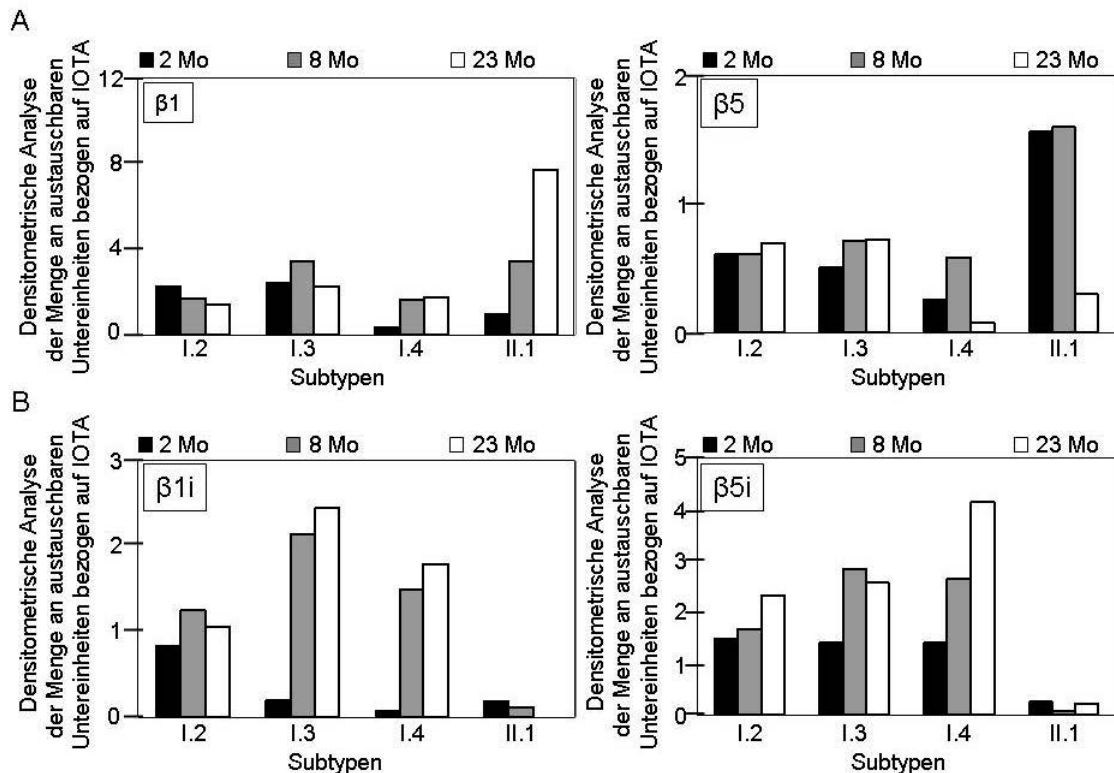


Abb. 20: Densitometrische Analyse der Menge an austauschbaren β -Untereinheiten in 20S Proteasomsubtypen I.2 – II.1 normalisiert auf $\alpha 1$. 500 ng jedes Subtyps wurden auf SDS-Gele aufgetragen. Durch Immunoblot wurden die Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 5$ (A) sowie die Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ (B) mit spezifischen Antikörpern detektiert und mittels ImageJ quantifiziert.

Bei Vergleich der jeweiligen Subtypen der drei Altersstufen konnte gezeigt werden, dass sich altersabhängig der Anteil an Immununtereinheiten in 20S Proteasom-Subtypen I.2-I.4 erhöhte (Abb. 20B). Subtypen II.1 - II.3 der 8 Mo alten Tiere wiesen eine sehr hohe caspaseähnliche Aktivität auf (Abb. 17C), was mit dem transienten Anstieg der Untereinheit $\beta 1$ im Einklang steht. Dieser konnte jedoch nur für Subtyp II.3 (Abb. 19) und III.2 (nicht gezeigt) nachgewiesen werden. Obwohl die Anzahl der Versuche keine statistische Analyse zuließ, muss vermutet werden dass die spezifischen proteasomalen Aktivitäten, die mit kurzen fluorogenen Substraten bestimmt wurden, nicht alleine von der Untereinheitenkonfiguration abhängen können.

3.4 Altersabhängige Veränderungen der Proteasom-Subtypen hinsichtlich ihrer Peptid-Prozessierung, ihrer Schnittpreferenzen und Peptid-Spleiß Aktivität

3.4.1 Vergleich der proteolytischen Prozessierung von Peptidsubstraten durch Subtypen 2 Mo alter Ratten

Zur Charakterisierung der proteolytischen Eigenschaften gereinigter proteasomaler Subtypen wurde der Abbau der bereits beschriebenen Peptidsubstrate GP100₄₀₋₅₂, GP100₃₅₋₅₇ sowie GP100₂₀₁₋₂₃₀ (siehe Abb. 13) analysiert. Aufgrund der limitierenden Menge der gereinigten Subtypen III.1 und III.2 sowie der Nebensubtypen aus Sub I und II konnten in den folgenden Studien nur die Subtypen I.2 – I.4 und II.1 – II.3 untersucht werden. Hauptaugenmerk auch dieser Untersuchung lag darauf festzustellen, ob Unterschiede bezüglich der proteolytischen Eigenschaften zwischen den Subtypen einer Subpopulation existieren.

Für alle untersuchten Subtypen wurden die gleichen Hydrolyseraten des 13mers GP100₄₀₋₅₂ (nicht gezeigt) und des 23mers GP100₃₅₋₅₇ (Anhang, Abb. A6) gemessen.

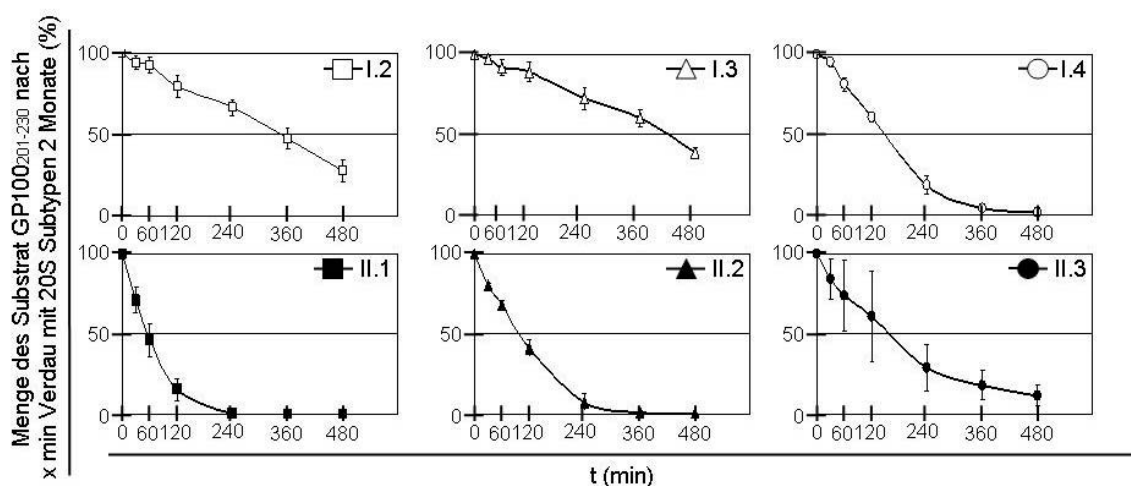


Abb. 21: Hydrolyse des Peptids GP100₂₀₁₋₂₃₀ durch Subtypen der Subpopulation I und II. 40 μ M des Peptids wurden mit 0,5 μ g 20S Proteasomsubtypen bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitwerten wurde die Menge des nicht prozessierten Substrates per ESI-MS bestimmt. Es sind Mittelwerte \pm SEM aus drei Versuchen angegeben.

Im Gegensatz dazu wurde das 30mer GP100₂₀₁₋₂₃₀ subtypenabhängig unterschiedlich schnell abgebaut (Abb. 21). Die Hydrolyserate nahm von den β 1i und β 5i enthaltenen

Subtypen I.2 und I.3 ($t/2 = 350$ bzw. 476 min) hin zu den Subtypen mit geringerem β li-Gehalt (I.4; $t/2 = 180$ min) bis zu den Subtypen, in denen kein β li nachweisbar war (II.2 und II.3; $t/2 = 78$ und 103 min) um das 4,5fache zu (Abb. 21). Interessanterweise wurde $t/2$ mit den Subtypen I.4 und II.3, die unterschiedliche spez. Aktivitäten und Untereinheitenkonfigurationen zeigten, jeweils nach 180 min erreicht. Diese Daten bestätigten, dass sich sowohl die Subtypen innerhalb einer Subpopulation, als auch die Subtypen zweier Subpopulationen, deutlich hinsichtlich ihrer proteolytischen Aktivität gegenüber Polypeptidsubstraten unterschieden.

3.4.2 Unterschiedliche Schnittpräferenzen in Subtypen der 2 Monate alten Ratten

Bei der Hydrolyse von Polypeptiden durch 20S Proteasomen werden Peptide verschiedener Länge gebildet. Alle gebildeten Peptide, die massenspektrometrisch identifiziert werden können, werden in Schnittkarten zusammengestellt (Anhang Abb.A7). Bei Hydrolyse des GP100₂₀₁₋₂₃₀ wurden 120 Peptide identifiziert. Durch Ermitteln der absoluten Menge dieser Fragmente (Mishto et al., 2012) konnten die Schnitthäufigkeiten der Subtypen I.2 – I.4 und II.1 – II.3 ermittelt und verglichen werden.

Alle untersuchten Subtypen schnitten das Substrat GP100₂₀₁₋₂₃₀ hauptsächlich C-terminal von neun verschiedenen Aminosäuren (Abb. 22). Es wurde keine Schnittstelle identifiziert, die nicht durch alle sechs Subtypen genutzt wurde. Signifikante Unterschiede wurden allerdings in der Häufigkeit gemessen, mit denen die verschiedenen Subtypen die spezifischen Peptidbindungen hydrolysierten. Diese Unterschiede waren aber nicht zwischen Subtypen einer Subpopulation zu erkennen, sondern nur bei Vergleich der Subtypen der zwei Subpopulationen I und II. Die Subtypen I.2 – I.4 bevorzugten die Schnitte nach Aminosäure 222 (Leucin, L), wohingegen die Subtypen II.1 – II.3 Präferenzen für die Peptidbindungen zwischen Aminosäuren 213 und 217 (Valin, V) sowie nach Aminosäure 220 (Serin, S) zeigten (Abb. 22).

Die untersuchten Subtypen hydrolysierten das Substrat also mit unterschiedlichen Schnitthäufigkeiten der einzelnen Peptidbindungen. Diese Beobachtung legte nahe, dass

Unterschiede bezüglich der zeitabhängigen Bildung von Peptiden und deren weiterer Abbau festgestellt werden können.

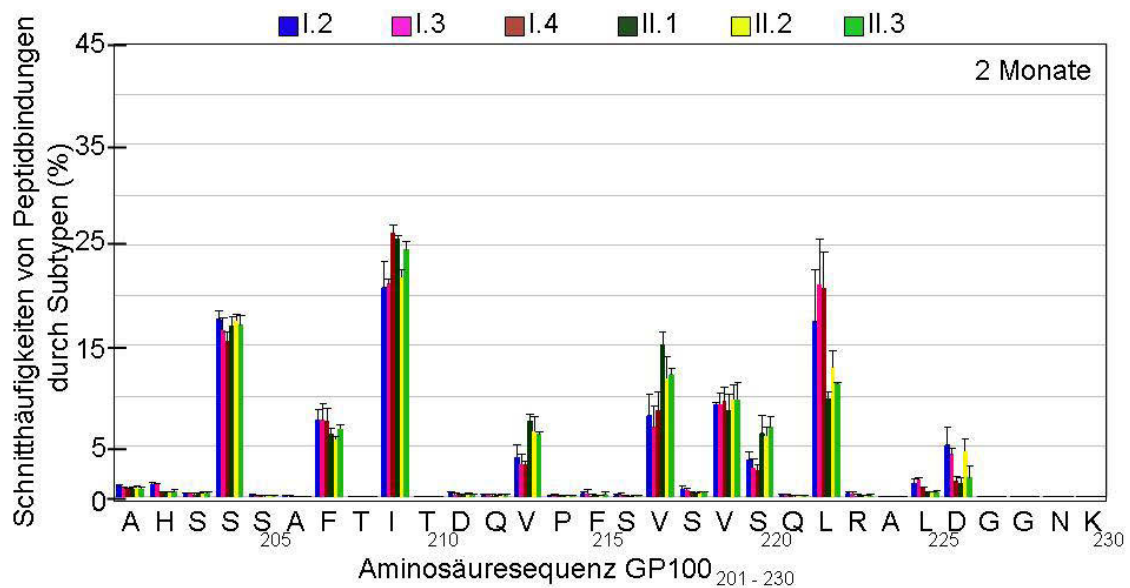


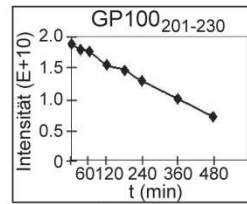
Abb. 22: Schnitthäufigkeiten von Subtypen bei der Hydrolyse von GP100₂₀₁₋₂₃₀. Durch Algorithmen (A. Goede) wurden alle zuvor identifizierten Fragmente zu Schnitthäufigkeitskarten (in %) zusammengestellt (Mishto et al., 2012). Mittelwerte \pm SD aus drei Analysen angegeben.

Von den beim Abbau des GP100₂₀₁₋₂₃₀ gebildeten Peptiden wurden anhand der hohen Schnitthäufigkeiten nach den Aminosäuren 209, 217 und 222 einige Peptide ausgewählt und deren zeitabhängige Bildung analysiert.

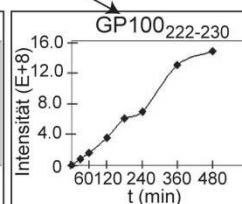
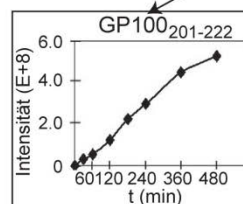
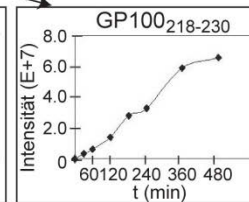
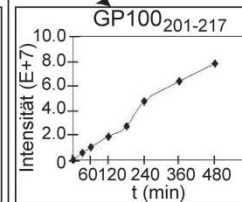
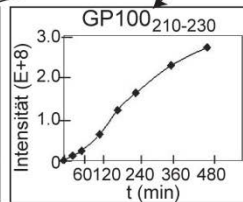
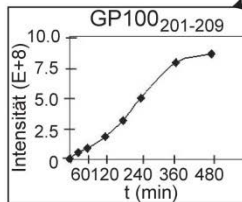
Aus den Subpopulationen I und II wurden die Subtypen I.2 und II.1 ausgewählt, die das Substrat GP100₂₀₁₋₂₃₀ mit unterschiedlicher Geschwindigkeit hydrolysieren (Abb. 23 A1 und B1). Auch bei Vergleich der Subtypen I.3 und I.4 mit II.2 und II.3 wurden die gleichen Verhältnisse gemessen (nicht gezeigt). In Abhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit wurden die Peptide GP100₂₀₁₋₂₀₉/GP100₂₁₀₋₂₃₀, GP100₂₀₁₋₂₁₇/GP100₂₁₈₋₂₃₀ sowie GP100₂₀₁₋₂₂₂/GP100₂₂₃₋₂₃₀ (Abb. 23 A2 und B2) mit unterschiedlicher Geschwindigkeit gebildet. Entsprechend der geringeren Schnittstellennutzung nach V₂₁₇ im Vergleich zu I₂₀₉ und L₂₂₂ (Abb. 22) war die gebildete Menge von GP100₂₀₁₋₂₁₇ und GP100₂₁₈₋₂₃₀ insgesamt geringer als die der anderen Peptide.

A1

Subtyp I.2

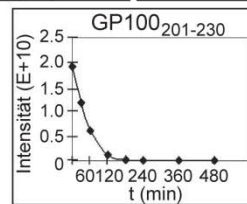


A2



B1

Subtyp II.1



B2

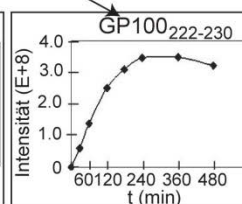
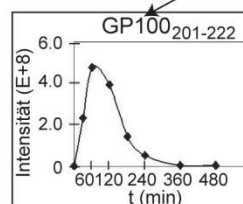
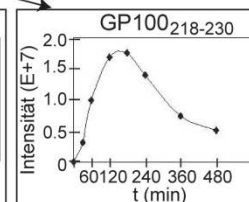
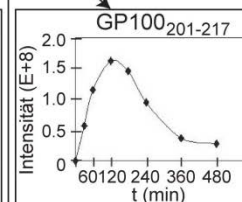
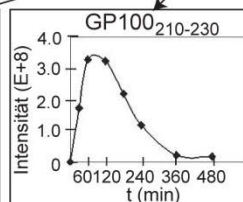
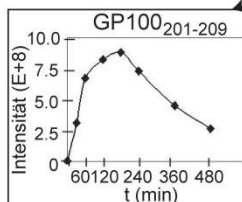


Abb. 23: Abbau des GP100₂₀₁₋₂₃₀ durch Subtyp I.2 (Tafel A1) und II.2 (Tafel B1) aus Leber 2 Mo alter Ratten. Dargestellt sind die gebildeten Mengen der Fragmente GP100₂₀₁₋₂₀₉, GP100₂₁₀₋₂₃₀, GP100₂₀₁₋₂₁₇ und GP100₂₁₈₋₂₃₀ sowie GP100₂₀₁₋₂₂₂ und GP100₂₂₂₋₂₃₀ (A2 und B2) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Insgesamt konnten 120 Fragmente beim Abbau des GP100₂₀₁₋₂₃₀ durch die Proteasom-Subtypen identifiziert werden. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Verdaus.

In Abhängigkeit von $t/2$ verringerte sich die Bildungsrate der Peptide nach 360 min mit Subtyp I.2 (Abb. 23 A2, GP100₂₀₁₋₂₀₉, GP100₂₁₈₋₂₃₀, GP100₂₂₃₋₂₃₀) bzw. nach 60 - 120 min mit Subtyp II.1 (Abb. 23 B2). Da diese Fragmente in den ersten Minuten des Verdaus gebildet wurden ließ sich vermuten, dass das Substrat initial in diese Peptide fragmentiert wurde. Über $t/2$ hinaus wurden sie durch Wiedereintritt in den Proteasom-Zylinder in kürzere Fragmente abgebaut, was an der deutlichen Mengenabnahme der Peptide (vor allem mit Subtyp II.1) über 120 min Inkubation hinaus zu erkennen war (Abb. 23 B2). Die erhöhte chymotryptische und caspaseähnliche Aktivität des Subtyps II.1 führte sehr schnell zur Bildung sekundäre Fragmente wie z.B. GP100₂₁₇₋₂₂₂ oder GP100₂₀₅₋₂₂₂ (nicht gezeigt).

Das Vorhandensein von $\beta 1i$ im 20S Proteasom (Subtyp I.2, Abb. 23A) schien den Abbau von GP100₂₀₁₋₂₃₀ und damit die Bildung der sekundären Peptide im Vergleich zu dem Abbau des Substrates mit Subtypen ohne $\beta 1i$ (Subtyp II.1, Abb. 23B) um das 5-fache zu verlangsamen. Anhand der Schnitthäufigkeiten war zu erkennen, dass bei schneller Hydrolyse des Substrates mehr Peptide gebildet wurden, die mit V₂₁₃ und V₂₁₇ endeten. Bei langsamem Abbau hingegen wurden mehr Peptide mit L₂₂₂ am C-Terminus detektiert (Abb. 22). Da die Spaltspezifitäten der Subtypen jedoch nicht grundsätzlich verschieden waren, müssten die unterschiedlichen Abbauraten des Substrats durch andere enzymatische Parameter, z.B. Substrataffinität oder Wechselzahl begründet sein.

3.4.3 Altersabhängige Veränderung der Schnittpräferenzen in Subtypen

Da bereits festgestellt wurde, dass sich die spezifischen Aktivitäten und Untereinheitenkonfigurationen von Subtypen im Alter verändern, wurden die Hydrolyseraten von verschiedenen Polypeptiden im Alterungsprozess untersucht.

Die Abbaurate von GP100₂₀₁₋₂₃₀ durch die Subtypen I.2 und I.3 stieg altersabhängig an (Abb. 24). Diese Subtypen 23 Mo alter Ratten waren chymotryptisch und tryptisch sehr aktiv und es waren hauptsächlich Immununtereinheiten in die 20S Proteasomen integriert. Dies hatte zur Folge, dass die Abbaurate des GP100₂₀₁₋₂₃₀ fast auf das Niveau der Subtypen ohne $\beta 1i$ anstieg. Subtyp I.4, dessen chymotryptische und tryptische Aktivität sich mit zunehmendem Alter der Tiere minimal veränderte, zeigte auch

gegenüber GP100₂₀₁₋₂₃₀ keine deutliche Veränderung. Tendenziell entsprach die zunehmende Abbaugeschwindigkeit von GP100₂₀₁₋₂₃₀ durch die Subtypen II.1-II.3 (Abb. 24) ebenfalls den beobachteten Veränderungen gegenüber den fluorogenen Substraten (Abb. 17) und der Abnahme des ohnehin niedrigen Gehaltes von β 1i in 23 Mo alten Ratten (Abb. 19). Die niedrige Hydrolyserate von II.3 bei 8 Mo alten Ratten dürfte eher auf Messprobleme zurückzuführen sein (siehe auch die große Standardabweichung der Messungen).

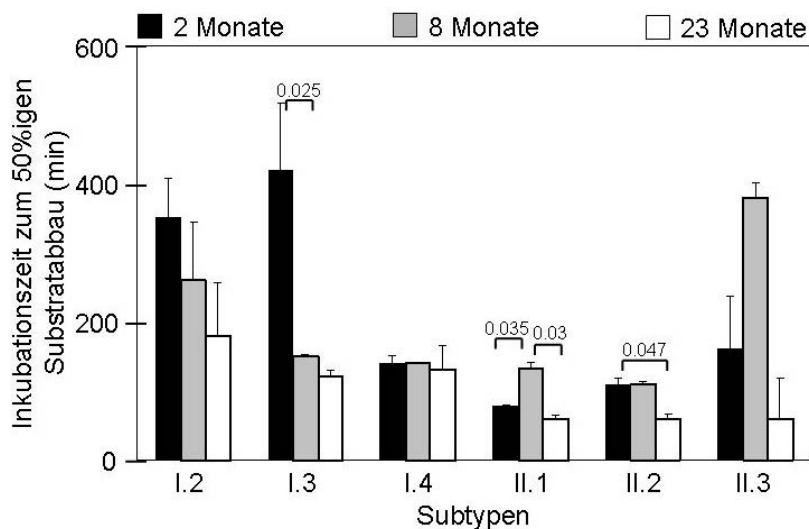


Abb. 24: Vergleich der Inkubationszeiträume bis t/2 von GP100₂₀₁₋₂₃₀ durch die Subtypen I.2-I.4 und II.1-II.3 2, 8 und 23 Mo alter Ratten. Es sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Verdaus sowie Signifikanzanzeigende P-Werte (Students t-Test) für den Vergleich der drei Altersstufen angegeben.

Auch die Schnitthäufigkeiten wurden in Hinblick auf das Altern untersucht. Für die Schnittstellen nach Aminosäure V₂₁₃ und L₂₂₂ wurden keine altersabhängigen Veränderungen gemessen (nicht gezeigt). Dennoch zeigten sich deutliche Unterschiede an vier Schnittstellen im 30mer GP100₂₀₁₋₂₃₀ (Abb. 25E).

Bei den Subtypen I.2 und I.3 stieg die chymotryptische und tryptische Aktivität im Alterungsprozess stark an (Abb. 17). Das führte zu verstärkter Nutzung der Schnittstelle I₂₀₉ im Alter verglichen mit 2 Mo (Abb. 25 A). Gleichzeitig nahm die Schnitthäufigkeit nach D₂₂₆ bei 8 und 23 Mo stark ab (Abb. 25 D). Die Nutzung dieser Schnittstelle scheint auch abhängig von der caspaseähnlichen Aktivität und dem Anteil der Standarduntereinheit β 1 zu sein (Abb. 17 und 20). Die Subtypen I.3 und I.4, die bei 2 und 23 Mo die niedrigste caspaseähnliche Aktivität zeigten, schnitten das Substrat nach D₂₂₆ mit der niedrigsten Häufigkeit, während für die Subtypen II.1 – II.3 8 Mo mit der höchsten caspaseähnlichen Aktivität auch die höchste Schnitthäufigkeit dieser Peptidbindung gemessen wurde (Abb. 25D). Im Gegensatz dazu hatte die caspaseähnliche Aktivität keinen Einfluss auf die Schnittstellennutzung C-terminal von

S₂₂₀ (Abb. 25C), bei der nur Subtyp I.2 eine transiente Zunahme der Schnitthäufigkeit im Alter von 8 Mo (Abb. 25C) zeigte, und führte sogar zu einer transienten Abnahme der Schnitthäufigkeit nach I₂₀₉ und V₂₁₇ mit Subtypen I.3 – II.3 im Alter von 8 Mo (Abb. 25A und B).

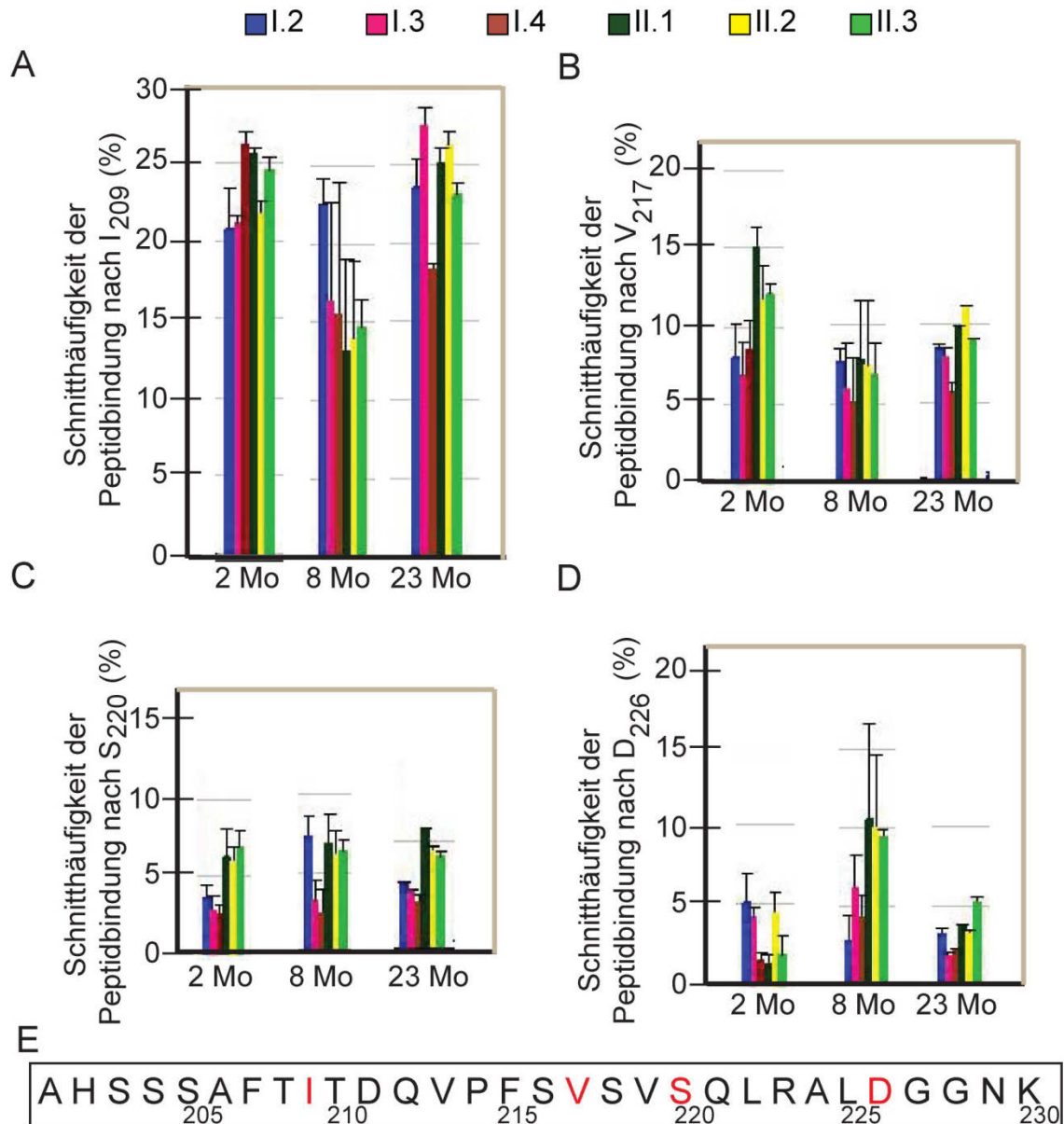


Abb. 25: Veränderung der Schnitthäufigkeiten C-terminal von den Aminosäuren 209 (A), 217 (B), 220 (C) und 226 (D) bei Abbau von GP100₂₀₁₋₂₃₀ durch Subtypen aus Lebern 2, 8 und 23 Mo alter Ratten. Die Aminosäuren, nach denen C-terminal geschnitten wurde, wurden in der parentalen Sequenz rot markiert (E). Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen sind angegeben.

Der starke Anstieg der chymotryptischen und tryptischen Aktivität im Alter hatte nur einen geringen Effekt auf die Schnitthäufigkeiten in dem hier untersuchten Substrat. Allein die Veränderungen der caspaseähnlichen Aktivität, vor allem im Alter von 8 Mo,

fürten zu einer deutlichen Veränderung der Schnittstellennutzung nach I₂₀₉, V₂₁₇ und D₂₂₆. Die Veränderungen der Schnitthäufigkeiten schienen nicht allein auf den Änderungen der mittels fluorogener Substrate bestimmten spezifischen Aktivitäten beruhen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich alle untersuchten Subtypen nicht nur bezüglich der spezifischen Aktivitäten und Untereinheitenkonfigurationen unterscheiden lassen, sondern dass jeder Subtyp auch ein individuelles Schnittmuster zeigt, dass sich altersabhängig verändert. Wie bereits die Untersuchungen über den Abbau von Polypeptidsubstraten durch die Proteasom-Subpopulationen gezeigt hatten, sind die altersabhängigen Veränderungen auch bei den Subtypen nicht gegenüber allen Substraten gleich. So wurden beispielsweise beim Abbau des 13mers GP100₄₀₋₅₂ keine signifikanten Unterschiede in der Abbaukinetik durch die verschiedenen Subtypen gemessen (nicht gezeigt).

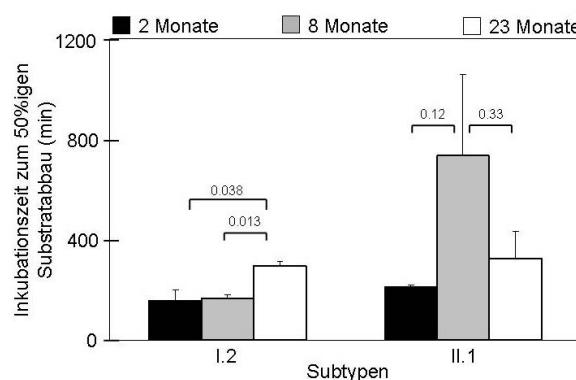


Abb. 26: Vergleich der Inkubationszeiten bis t/2 bei Abbau von GP100₃₅₋₅₇ durch die Subtypen I.2 und II.1 von 2, 8 und 23 Mo alten Ratten. Die proteolytischen Eigenschaften der Subtypen zeigen altersabhängige Veränderungen. Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten angegeben. Mittels Students t-Test ermittelte P-Werte für den Vergleich von 2 Mo mit 8 und 23 Mo, bzw. für den Vergleich von 8 Mo mit 23 Mo sind angegeben.

Auf der anderen Seite baute der Subtyp I.2 das 23mer GP100₃₅₋₅₇ mit zunehmendem Alter der Ratten signifikant langsamer ab, wohingegen die scheinbar drastische Verlangsamung der Hydrolysegeschwindigkeit durch Subtyp II.2 bei 8 Mo alten Ratten keine statistische Signifikanz erreichte (Abb 26). Zwischen den Subtypen der jeweiligen Subpopulationen traten keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Hydrolyseraten auf (Anhang, Abb.A8 A und B). Auch eine Veränderung der Schnitthäufigkeiten konnte nicht gemessen werden (nicht gezeigt). Alle Subtypen bauten das Substrat durch die Hauptschnitte nach Aminosäure L₃₉ und L₄₈ (Abb. 27) ab.



Die prote Abb. 27: Hauptschnitte bei Abbau von GP100₃₅₋₅₇ durch Subtypen. Die im Laufe der Zeit gebildeten Fragmente GP100_{35-39/40-57} sowie GP100_{35-48/49-57} werden in großer Menge gebildet.

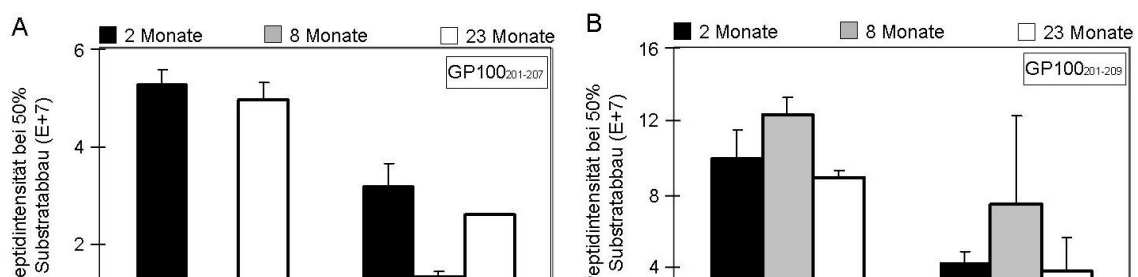
des Alters individuell. Auch wenn die Unterschiede vor allem zwischen den Subtypen einer Subpopulation aufgrund der großen Standardabweichungen häufig nicht signifikant waren, konnte gezeigt werden, dass auch kleine Veränderungen der spezifischen Aktivitäten und Untereinheitenkonfigurationen große Auswirkungen auf das Verhalten der Subtyp gegenüber den verschiedenen Polypeptiden haben können.

3.4.4 Protein-Spleißen durch 20S Proteasom-Subtypen bzw. Subpopulationen

Eine weitere Aktivität von Proteasomen wurde erst kürzlich als „proteasomabhängiges Peptidspleißen“ beschrieben (Vigneron et al., 2004). Die Bildung von Spleißprodukten spielt wahrscheinlich eine Rolle in der Antigen-Präsentation (Warren et al., 2006). Beim Abbau des GP100₂₀₁₋₂₃₀ durch die Leber-Proteasom-Subtypen wurden massenspektrometrisch ebenfalls gespleißte Peptide identifiziert. Für diese Untersuchungen sind die Daten für die Subtypen I.2 und II.1 nachfolgend gezeigt.

Beide Subtypen stellten das Spaltpeptid GP100₂₀₁₋₂₀₇ in großen Mengen her, wenn sie aus 2 und 23 Mo alten Tieren isoliert worden waren. Die Subtypen aus 8 Mo alten Ratten waren in dieser Hinsicht deutlich weniger aktiv (Abb. 28A). Umgekehrt war die Bildung des Spaltpeptids GP100₂₀₁₋₂₀₉ am höchsten durch die Subtypen 8 Mo alter Tiere (Abb. 28 B). Die Bildung des gespleißten Peptids GP100_{201-207/201-207} folgte nur partiell der Bildungsmenge von GP100₂₀₁₋₂₀₇. Sie war am höchsten bei Subtyp I.2 2 Mo junger Tiere, wohingegen die Spleißproduktbildung durch Subtyp I.2 von 23 Mo alten Tieren deutlich geringer war, aber immer noch höher als durch Subtyp I.2 von 8 Mo alten Tieren (Abb. 28C).

Entsprechend der effektiven Bildung des GP100₂₀₁₋₂₀₉ bei Hydrolyse des GP100₂₀₁₋₂₃₀ durch Subtypen 8 Mo alter Ratten wurde auch GP100_{201-209/201-207} vermehrt gebildet (Abb. 28D). Generell war die Bildungsrate gespleißter Peptide mit Subtyp II.1 niedriger als mit Subtyp I.2. Ähnliche Resultate wurden auch bei einem Vergleich der anderen untersuchten Subtypen (I.3 und II.2 bzw. I.4 und II.3) erzielt (nicht gezeigt).



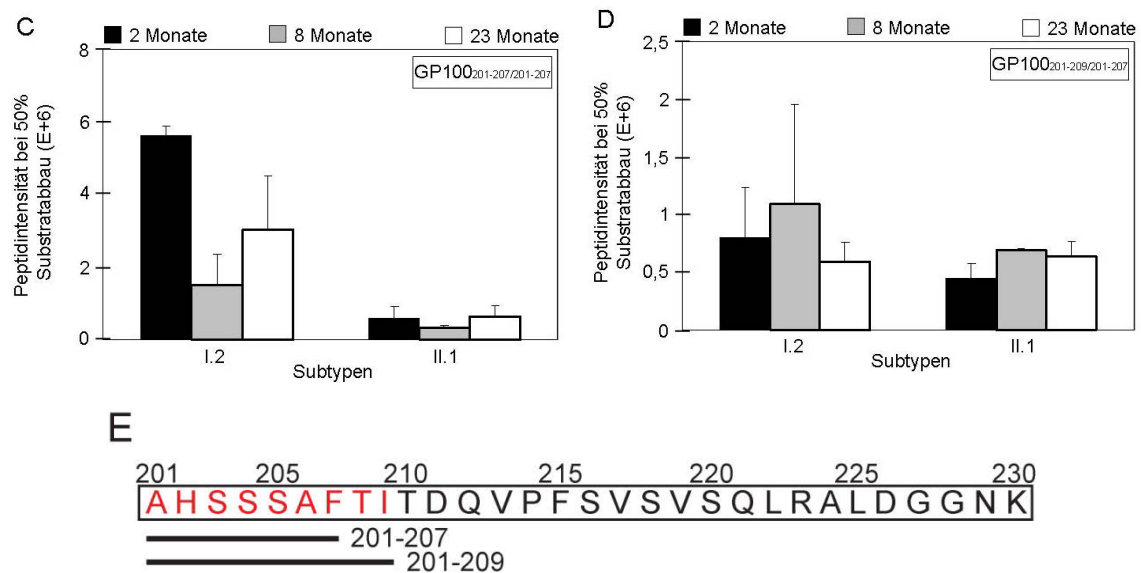


Abb. 28: Intensität der generierten Peptide GP100₂₀₁₋₂₀₇ und GP100₂₀₁₋₂₀₉ (A und B) sowie der Spleiß-Produkte GP100_{201-207/201-207} und GP100_{201-209/201-207} (C und D) durch die Subtypen I.2 und II.2 von 2, 8 und 23 Mo alten Ratten bei einer Substratabbaurate von 50%. Sequenz des als Substrat verwendeten GP100₂₀₁₋₂₃₀ (E). Die Signal-Intensitäten der Peptide wurden aus drei unabhängigen Verdaus gemittelt. Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Untersuchungen sind angegeben.

Da die proteolytische Aktivität des Proteasoms durch den Proteasom-Aktivator PA28 deutlich gesteigert werden kann, könnte durch den Aktivator auch die Bildungsrate von gespleißten Peptiden gesteigert werden.

Zur Untersuchung des PA28-Effekts auf die Spleißfrequenz wurden die Proteasom-Subpopulationen Sub I und II mit PA28 (im molaren Verhältnis 1:2) vorinkubiert, bevor diese Ansätze mit dem Peptidsubstrat GP100₄₀₋₅₂ inkubiert wurden. Der zeitliche Verlauf des Substratabbaus sowie die Bildung von Spleißpeptiden in An- und Abwesenheit von PA28 wurden mittels ESI-MS Analyse verfolgt.

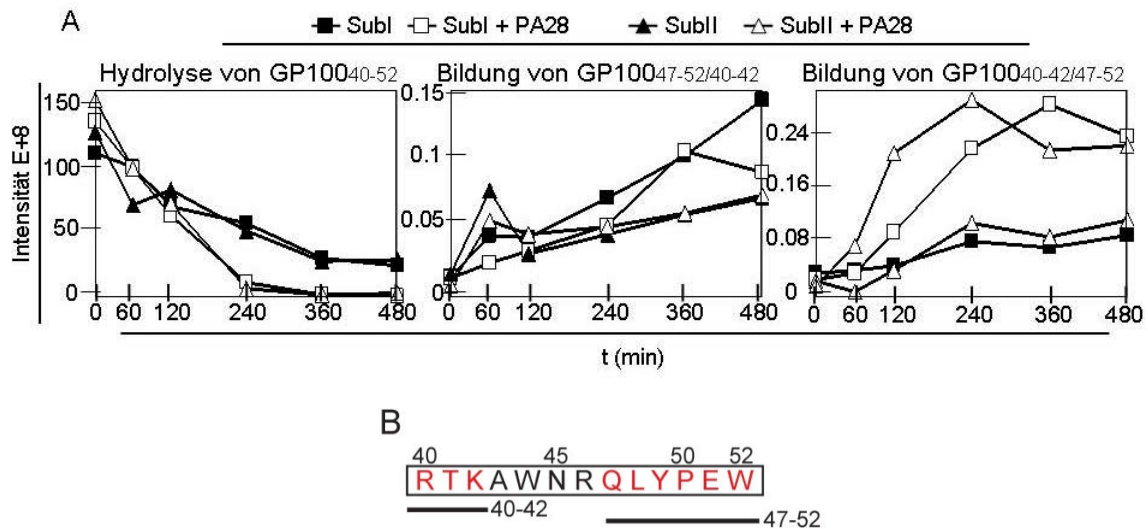


Abb.29: Abbau von GP100₄₀₋₅₂ und Bildung der Spleiß-Produkte Gp100_{47-52/40-42} und GP100_{40-42/47-52} durch Sub I und II in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (A). Sequenz des Substrats GP100₄₀₋₅₂ mit den Fragmenten, aus denen die gespleißten Peptide gebildet werden (B). Durch Zugabe des PA28 zu den Verdauungsansätzen wird die Hydrolyse des Substrates, sowie die Bildung des GP100_{40-42/47-52} deutlich beschleunigt.

Durch Zugabe des Proteasom-Aktivators PA28 wurde die Hydrolysegeschwindigkeit des Substrates signifikant erhöht (Abb. 29). In Folge dessen wurde auch die Bildung der Peptide GP100₄₀₋₄₂ und GP100₄₇₋₅₂ signifikant erhöht (Anhang, Abb. A9). Diese Peptide wurden durch das 20S Proteasom zu zwei verschiedenen Spleißpeptiden zusammengefügt: GP100_{47-52/40-42}, bei dem das Fragment GP100₄₀₋₄₂ mit der ersten Aminosäure (Arginin, R) an die letzte Aminosäure des Fragments GP100₄₇₋₅₂ (Tryptophan, W) kondensiert wird. Das zweite Peptid ist GP100_{40-42/47-52}, bei dem das Lysin (K) des Fragments GP100₄₀₋₄₂ mit der Aminosäure Glutamin (Q) des Peptids GP100₄₇₋₅₂ verbunden wird. Der Aktivator PA28 bewirkt eine signifikant verstärkte Bildung von GP100_{40-42/47-52}, das GP100_{47-52/40-42} dagegen wurde nicht vermehrt gebildet (Abb. 29). Mittels der QME-Methode (Mishto et al., 2012) konnten die Mengen (pmol) gebildeter Peptide bestimmt werden. Mit Hilfe der gleichen Methode wurde, bezogen auf die Menge des eingesetzten Substrates, die Menge des abgebauten Substrates (nmol) pro Zeitwert bestimmt. Die Menge des gebildeten Spleißproduktes wurde auf die abgebaute Substratmenge bezogen und es wurde ein Mittelwert (Menge des gebildeten Produktes (pmol) pro nmol abgebautes Substrat) aus allen analysierten Zeitwerten dargestellt (Abb. 30).

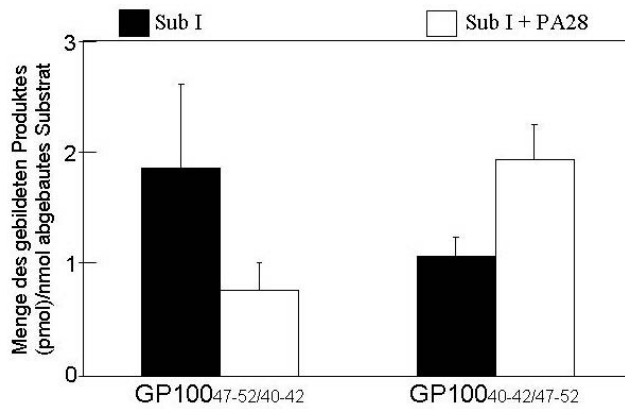


Abb.30: Darstellung der Menge der gebildeten Spleißprodukte, Gp100_{47-52/40-42} und Gp100_{40-42/47-52}, bezogen auf die Menge des umgesetzten Substrates. Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Durch Zugabe des Proteasom-Aktivators PA28 zu den Hydrolyseansätzen bestehend aus 20S Proteasom (Sub I und II) und dem Substrat GP100₄₀₋₅₂ wurde die Bildung des Gp100_{47-52/40-42} gegenüber den Ansätzen ohne PA28 von 1,8 pmol/nmol abgebautes Substrat auf 0,8 pmol/nmol abgebautes Substrat reduziert (Abb. 30). Im Gegensatz dazu wurde die Bildung des gespleißten Peptids Gp100_{40-42/47-52} signifikant verstärkt. Ohne die Zugabe des Aktivators PA28 wurde pro nmol abgebautes Substrat 1 pmol dieses Peptids gebildet. Nach Zugabe von PA28 wurde eine Menge von 1,9 pmol/nmol hydrolysiertes Substrat gemessen. Diese Werte wurden sowohl bei der Hydrolyse mit Sub I als auch mit Sub II gemessen. Hinsichtlich des Einflusses von PA28 auf die Spaltspezifität der 20S Proteasomen aus Sub I und Sub II wurden keine Unterschiede festgestellt (nicht gezeigt).

3.5 Reinigung von 20S Proteasomen aus Humanleberzellen sowie aus Humanleber

Die 20S Proteasom-Population eines Organs (bislang mit Rattenherz und Rattenleber getestet) lässt sich in drei Subpopulationen unterteilen, die weiter in Subtypen trennbar sind. Dabei zeigt sich für jedes Organ ein spezifisches Subtypen-Muster. Im Folgenden wurde diese Art der Proteasom-Reinigung auf Humanleber und humane Hepatocyten

(HUH-7) angewendet, um zu untersuchen, ob das Subtypenspektrum der Proteasomen aus Humanleber vergleichbar dem aus Rattenleber ist. Vergleichsweise wurde die gleiche Analyse der Proteasomen-Population einer Human-Hepatocyten-Zelllinie durchgeführt.

3.5.1 Trennung von Proteasom-Subpopulationen und Subtypen aus Humanleber im Vergleich mit humanen Hepatocyten

Nach Reinigung der 20S Proteasomen aus Humanleber konnten, wie bereits für Rattenleber beschrieben, mittels hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) drei verschiedene Subpopulationen voneinander getrennt werden (Abb. 31A). Nach Messung der chymotryptischen Aktivität in den Fraktionen konnten in Übereinstimmung mit den Maxima des UV-Spektrums drei Subpopulationen isoliert werden (Abb. 31C).

Nach dem gleichen Protokoll wurden 20S Proteasomen aus der humanen Hepatocyten-Zelllinie HUH-7 gereinigt. Im finalen Reinigungsschritt der 20S Proteasomen über eine HIC-Säule konnte im UV-Spektrum bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 0,78 – 0,85 M nur ein Proteinpeak detektiert werden (Abb. 31B), der auch die gesamte chymotryptische Aktivität (Abb. 31D) in sich vereint; es konnten somit keine proteasomalen Subpopulationen in HUH-7 Zellen nachgewiesen werden. Sowohl in den humanen 20S Proteasom-Subpopulationen I-III wie auch im HUH7-Gesamtpool wurden die spezifischen proteasomalen Aktivitäten mit fluorogenen Substraten bestimmt (Abb. 32).

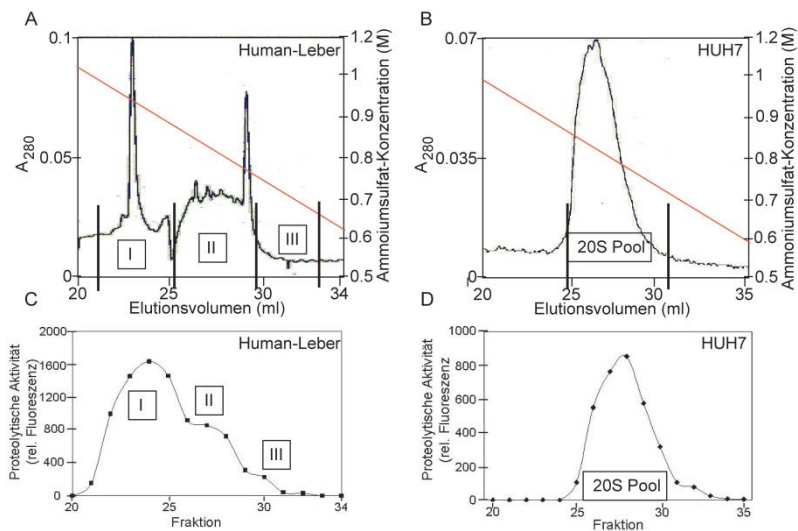


Abb. 31: HIC-Chromatographie von 20S Proteasomen aus Humanleber (A, C) und HUH-7 Hepatocyten (B, D). Nur der Chromatographie-Ausschnitt von 0,6 - 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ist gezeigt. Proteolytisch aktive Fraktionen mit einem Volumen von 1 ml wurden zu Subpopulationen I, II und III bzw. HUH7 20S Proteasomen vereinigt (C, D).

Die 20S Proteasom-Subpopulationen aus Humanleber zeigten nur geringe Unterschiede hinsichtlich der chymotryptischen Aktivität (SLLVY-MCA, Abb. 32A). Sub I zeigte allerdings die niedrigste caspaseähnliche Aktivität (ZLLE-MCA). 20S Proteasomen isoliert aus HUH-7 Hepatocyten (Abb. 32B) hatten gleich hohe chymotryptische und caspaseähnliche Aktivität und sein Aktivitätsmuster glich am ehesten Sub III. Die tryptische Aktivität der aus humanem Material isolierten 20S Proteasomen war immer sehr niedrig (Abb. 32A, B).

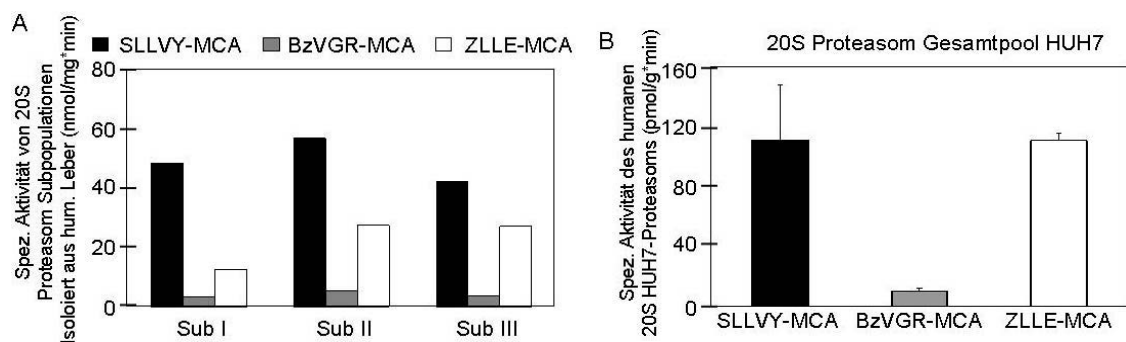


Abb. 32: Bestimmung spezifischer proteasomaler Aktivitäten der gereinigten humanen 20S Proteasom-Subpopulationen (A) und des 20S Proteasoms aus HUH7-Hepatocyten (B) mit fluorogenen Substraten.

3.5.2 Untereinheiten-Analyse von humanen 20S Subpopulationen mittels 2D – und 1D Gelelektrophorese

Die Subpopulationen aus Humanleber sowie auch das gereinigte 20S Proteasom aus Hepatocyten wurde mittels 2D PAGE analysiert (Abb. 33, A-C SubI-III, D HUH7). Die humanen 20S Sub I – III enthielten ebenso wie die Subpopulationen aus Rattenleber intermediäre Proteasomen. Der Anteil der Untereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ nahm von Subpopulation I bis Subpopulation III deutlich ab, während der Anteil der Standarduntereinheiten $\beta 1$ und $\beta 5$ in gleichem Maß zunahm (Abb. 33, A – C).

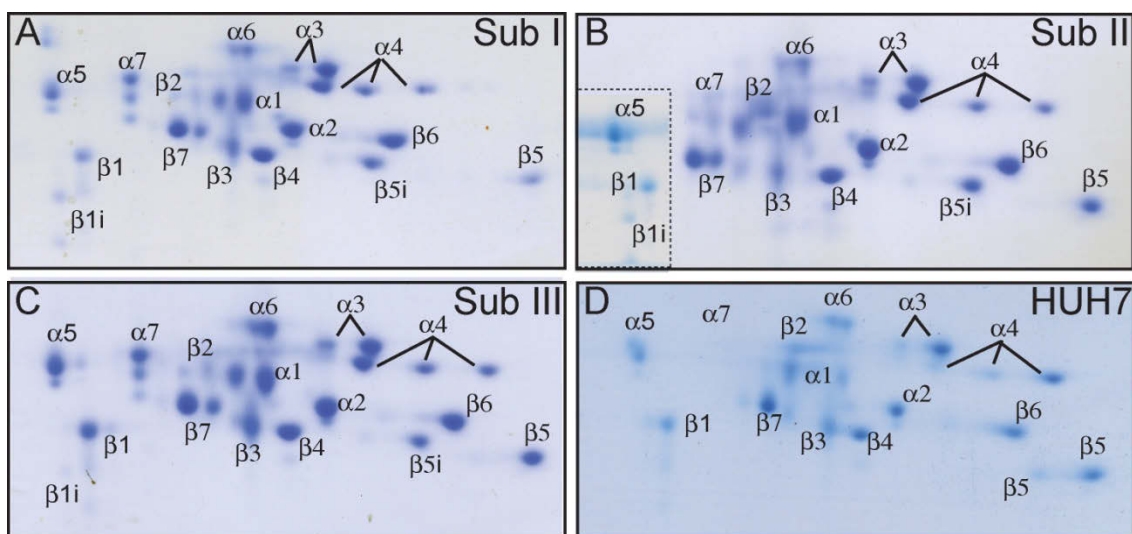


Abb. 33: 2D –PAGE der Humanleber 20S Proteasom Subpopulationen I – III sowie des 20S Proteasoms aus HUH7- Hepatocyten. Je 30 μ g der 20S Proteasomen wurden auf 2D Gelen aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Aufgrund technischer Schwierigkeiten beim Übertrag der ersten auf die zweite Dimension wurde der von der gestrichelten Linie umrandete Ausschnitt in B aus einem später angefertigten Gel zugefügt. Untereinheiten wurden anhand eines Referenzgels identifiziert (Schmidt et al, 2006)

In den aus HUH7 Zellen gereinigten 20S Proteasomen konnten weder mittels Coomassiefärbung noch mit Silberfärbung (nicht gezeigt) Immununtereinheiten detektiert werden (Abb. 33D). Proteasom aus HUH7 Hepatocyten enthalten demnach nur Standardproteasomen.

Die Ergebnisse der 2D-Analyse konnten auch mittels eines 1D Western/Immun-Blots bestätigt werden (nicht gezeigt).

3.5.3 Trennung von 20S Proteasom-Subpopulationen aus Humanleber und Hepatocyten in Subtypen

Die 20S Proteasom-Subpopulationen aus Humanleber und HUH7 Zellen wurden durch Anionenaustausch-Chromatographie am SMART System in Subtypen getrennt (Abb. 34). Ähnlichkeiten zwischen den Subtypenspektren von Humanleber und Rattenleber waren sehr gering.

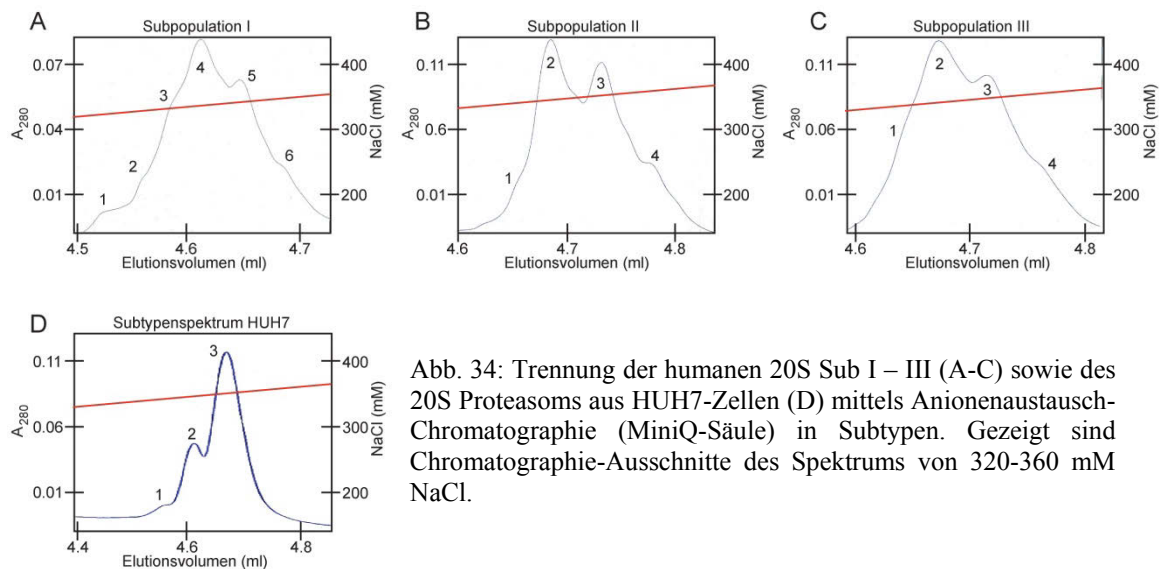


Abb. 34: Trennung der humanen 20S Sub I – III (A-C) sowie des 20S Proteasoms aus HUH7-Zellen (D) mittels Anionenaustausch-Chromatographie (MiniQ-Säule) in Subtypen. Gezeigt sind Chromatographie-Ausschnitte des Spektrums von 320-360 mM NaCl.

Das aus den 20S Proteasomen der HUH7-Zellen erhaltene Subtypenspektrum ähnelte keinem der zuvor aufgenommenen 20S Proteasom-Subtypenspektren der Leber, da nur drei Subtypen bei einer Salzkonzentration von 340 – 350 mM von der MiniQ Säule eluiert wurden. Dieses Spektrum ähnelte dem der 20S Proteasomen aus Humanhirn (Frontal-Cortex), das ausschließlich Standardproteasomen enthält (Gillardon et al., 2007) sowie dem Spektrum der 20S Proteasomen aus Hela-Zellen, die stressfrei kultiviert worden sind (Klare et al., 2007).

Die Subtypen aus Humanleber und HUH7-Zellen wurden mittels Western Blot hinsichtlich ihres Gehalts an Immununtereinheiten analysiert (Anhang, A10; Abb. 35). Wie bereits die 2D-PAGE Analysen der Subpopulationen gezeigt haben, enthielt die Humanleber ausschließlich Intermediärproteasomen. Alle Subtypen enthielten mehr oder weniger gleichermaßen die Untereinheiten $\beta 5$ und $\beta 5i$. Die Immununtereinheit $\beta 1i$ wurden nur in den Subtypen I.2 – I.5 und II.2 – II.4 nachgewiesen, nicht jedoch in II.4

und III.1 – III.3. Diese Subtypen enthielten umso mehr die Standarduntereinheit $\beta 1$ (Abb. 35A). Im Gegensatz zu den Subtypen der humanen Leber waren die Subtypen I – III der humanen Hepatocytenzelllinie (HUH7) reine 20S Standardproteasomen, da in ihnen keine Immununtereinheiten nachgewiesen werden konnten (Abb. 35B).

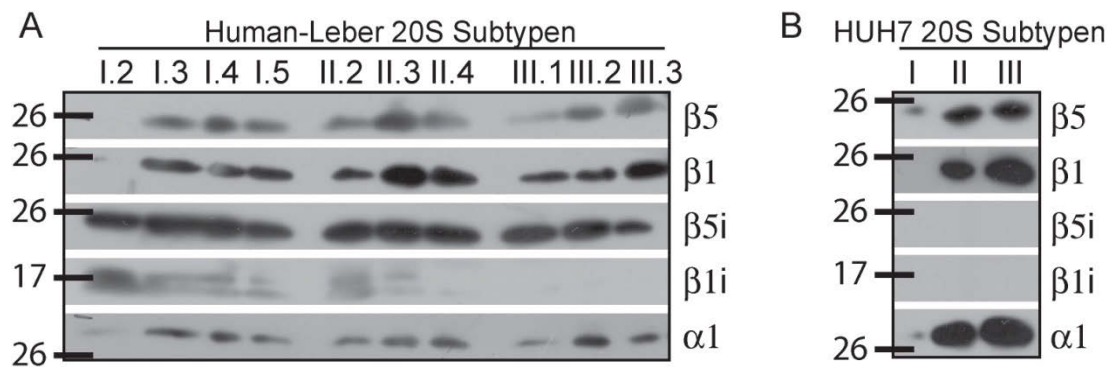


Abb. 35: Analyse des Gehaltes austauschbarer β -Untereinheiten in humanen 20S Lebersubtypen (A) sowie in Subtypen isoliert aus humanen HUH7-Hepatocyten (B) mittels Western Blot. Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde bereits gezeigt (Abb. 12).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Proteasom-Subtypen-Spektren für jedes Organ jeder Spezies, für jede Altersstufe und für jeden Zelltyp spezifisch sind. Eine Übereinstimmung der Subtypen aus Rattenleber und Humanleber gibt es insofern, dass Subtypen mit hohen Anteilen der Immununtereinheit $\beta 1i$ höhere Hydrophobizität aufweisen als Subtypen mit höheren Anteilen der Standarduntereinheiten und somit bei der HIC-Chromatographie als Sub I von der HIC-Säule eluiert werden konnten (Abb. 5, Abb. 31).

3.5.4 Peptidverdau mit humanen 20S Proteasom-Subtypen

Um die proteolytische Aktivität der Humanleber Proteasom-Subtypen zu vergleichen, wurde der Abbau des Polypeptids GP100₂₀₁₋₂₃₀ mit den Subtypen I.3, II.3 und III.3 als Vertreter der jeweiligen Subpopulation untersucht. Wie in Abb 36A gezeigt, waren 50% des Substrats nach 180 min Inkubation mit Subtyp I.3 abgebaut waren. Bei Inkubation

mit Subtyp II.3 und mit Subtyp III.3 war die gleiche Menge des Substrats bereits nach 120 min bzw. 90 min abgebaut (Abb. 36A).

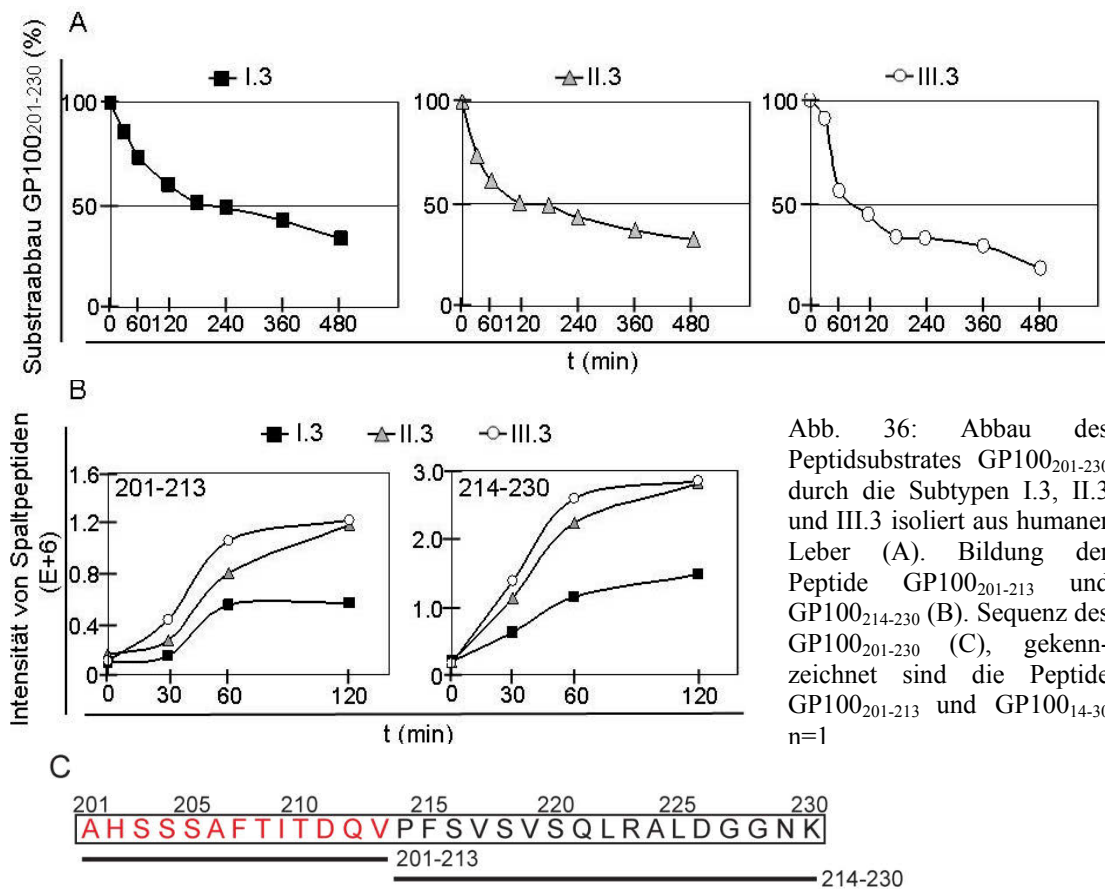


Abb. 36: Abbau des Peptidsubstrates GP100₂₀₁₋₂₃₀ durch die Subtypen I.3, II.3 und III.3 isoliert aus humaner Leber (A). Bildung der Peptide GP100₂₀₁₋₂₁₃ und GP100₂₁₄₋₂₃₀ (B). Sequenz des GP100₂₀₁₋₂₃₀ (C), gekennzeichnet sind die Peptide GP100₂₀₁₋₂₁₃ und GP100₂₁₄₋₂₃₀ n=1

Entsprechend der Unterschiede in der Abbaugeschwindigkeit des GP100₂₀₁₋₂₃₀ durch Subtyp I.3, II.2 und III.3 wurden auch die Spaltfragmente GP100₂₀₁₋₂₁₃ und GP100₂₁₄₋₂₃₀ durch die Subtypen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit gebildet, wobei I.3 erwartungsgemäß deutlich am langsamsten arbeitete (Abb. 36B). Nach Erreichen des 50%igen Substratabbaus wurden die beiden Spaltpeptide GP100₂₀₁₋₂₁₃ und GP100₂₁₄₋₂₃₀ weiter hydrolysiert, so dass keine weitere Mengenzunahme nach 120 min Inkubation gemessen werden konnte. Dies entsprach den Ergebnissen der Untersuchungen mit Proteasom-Subtypen aus Rattenleber (siehe 3.4). Ein abnehmender β 1i-Gehalt der Proteasom-Subtypen geht mit einer erhöhten Abbaurrate des Substrates und schnellerer Spaltpeptid-Bildung einher. Aufgrund der limitierten Menge der aus Humanleber gereinigten Subtypen konnte dieses Experiment nur einmal durchgeführt werden.

4. Diskussion

Für die Aufrechterhaltung der Zell-Homöostase ist eine strenge Regulation der Proteinsynthese und des Proteinabbaus essentiell. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist – neben den lysosomalen Cathepsinen - hauptverantwortlich für den Abbau intrazellulärer Proteine. Potentielle Substrate dieses Abbauweges werden mit einer Polyubiquitinkette markiert, die als Erkennungs- und Bindungsmerkmal für den 19S Regulator des 26S Proteasoms dient. Während die Ubiquitin-Moleküle unverändert wieder freigesetzt werden (Glickman and Ciechanover, 2002), wird das eigentliche Substratprotein vom 20S Proteasom in Peptid-Fragmente verschiedenener Länge gespalten, von denen ein Teil als Epitope des MHC I Antigen-Präsentationswegs von der Zelle genutzt wird (Rock and Goldberg, 1999). Proteasomen sichern durch gezielten Abbau oder limitierte Proteolyse von Proteinen beinahe aller zellulären Prozesse die Funktionalität von Zellen; das wiederum erfordert große Flexibilität des UPS, um auf verschiedene biologische Einflüsse reagieren zu können. Diese Flexibilität spiegelt sich unter anderem in der gewebe-, zell- und kompartiment-spezifischen Untereinheiten-Stöchiometrie der 20S Proteasom-Komplexe und ihrer proteolytischen Eigenschaften wider (Dahlmann et al., 2000; Froment et al., 2005; Klare et al., 2007; Noda et al., 2000; Palmer et al., 1996; Raijmakers et al., 2008). Durch Stimuli wie Infektionen, Stress oder Altern wird die Expression von proteasomalen Untereinheiten der Situation in der Zelle angepasst (Aki et al., 1994; Rodriguez et al., 2010; Sijts et al., 2000b).

Die Ergebnisse von Untersuchungen proteasomaler Funktionen in Gewebeextrakten sind nicht vergleichbar mit denen gereinigter Proteasomen, da Messungen in Gewebeextrakten einen Mittelwert aller Proteasom-Komplexe (20S, 26S, Hybridproteasom, 20S-PA28) der Zellen oder des Gewebes darstellen. Bei Untersuchungen gereinigter Proteasomen spielen die verwendeten Reinigungs- und Trennmethode eine große Rolle. Durch Elution von Proteasomen bei unterschiedlichen Kaliumacetat-Konzentrationen wurden bereits 1989 aus *Drosophila* drei proteasomale Subfraktionen mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten getrennt (Falkenburg and Klotzel, 1989). In Hepatocyten wurden Proteasomen elektronenmikroskopisch in verschiedenen Zellkompartimenten nachgewiesen und vermutet, dass Proteasomen mit unterschiedlicher Lokalisation in der Zelle unterschiedliche Funktionen haben (Rivett et al., 1992).

20S Proteasom-Populationen existieren in großer Vielfalt sowohl in einzelnen Zellen (Hori et al., 1999; Palmer et al., 1996) als auch in verschiedenen Geweben (Cardozo and Kohanski, 1998; Eleuteri et al., 1997). Das beruht einerseits auf der Tatsache, dass sich Proteasomen bezüglich ihres Gehalts an proteolytisch aktiven β -Untereinheiten unterscheiden, nämlich $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ enthaltende Standardproteasomen, $\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$ enthaltende Immunproteasomen und Intermediärproteasomen, die Standard- und Immununtereinheiten in unterschiedlicher Stöchiometrie enthalten. Alle drei unterscheiden sich hinsichtlich ihrer proteolytischen Aktivitäten und Hemmbarkeit (Aki et al., 1994; Dalet et al., 2011; Kloss et al., 2009; Kuckelkorn et al., 1995; Wang et al., 2011). Diese drei großen Populationen von Proteasomen lassen sich darüber hinaus in Subpopulationen und Subtypen unterscheiden, die dadurch zustande kommen, dass Untereinheiten des Proteasoms in Isoformen vorkommen, die teilweise durch differentielles Splicing gebildet (Yuan et al., 1996) und/oder durch verschiedene posttranslationale Modifikationen verändert werden können (Mason et al., 1996; Mittenberg et al., 2008; Overath et al., 2012).

Proteasom-Subpopulationen lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Oberflächenhydrophobizität chromatographisch voneinander trennen (Kloss et al., 2009). Jede Subpopulation kann wiederum in mehrere Subtypen mit unterschiedlicher Oberflächenladung getrennt werden (siehe 3.3.1; Kloss et al., 2009; Schmidt et al., 2006). Das Subtypen-Spektrum ist zell- und gewebespezifisch. Durch Stimuli, wie z.B. $\text{IFN}\gamma$ oder durch Induktion von Krankheiten (Diabetes mellitus), lässt sich eine deutliche Veränderung des Proteasom-Subtypen-Spektrums nachweisen (Klare et al., 2007; Merforth et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an 20S Proteasomen aus Rattenleber durchgeführt. Die Enzyme wurden in drei Subpopulationen und diese anschließend in Proteasom-Subtypen getrennt. Ein Vergleich der proteasomalen Subpopulationen sowie ihrer Subtypen in der Rattenleber von jungen (2 Monate), erwachsenen (8 Monate) und alten (23 Monate) Tieren zeigte deutliche altersabhängige Veränderungen sowohl hinsichtlich der β -Untereinheiten-Stöchiometrie als auch der proteolytischen Eigenschaften einzelner Subtypen.

4.1 Analyse von Proteasom-Populationen

4.1.1 Untersuchung von Proteasomen in Leber-Extrakten von Ratten im Vergleich zu gereinigten 20S Proteasom-Subpopulationen

In den zahlreichen Untersuchungen über altersabhängige Veränderungen von Proteasomen in Rattenleber wurden sehr unterschiedliche Befunde erhoben. Bezüglich der Proteasomen-Mengen wurden keine Veränderungen (Carrard et al., 2003; Shibatani et al., 1996), eine Zunahme (Husom et al., 2004) oder eine Abnahme gemessen (Hayashi and Goto, 1998). In Übereinstimmung mit den Daten von Hayashi und Goto wurde in der vorliegenden Untersuchung in Leber-Extrakten eine abnehmende Proteasom-Konzentration mit zunehmendem Alter bestimmt (siehe 3.1.1; Hayashi and Goto, 1998). Im Alter lässt sich in Rattenleber eine signifikante Zunahme des rauen endoplasmatischen Retikulums (RER) nachweisen (Schmucker, 1990, 2005), wodurch die Beobachtung einer alterabhängigen Zunahme mikrosomaler Proteasomen erklärlich wird (Rodriguez et al., 2010). In der vorliegenden Untersuchung wurden bei der Herstellung der Gewebeextrakte keine Detergenzien zum Lösen von Organell-gebundenen Proteasomen verwendet, so dass diese durch Zentrifugation aus den Geweberohextrakten entfernt wurden. Somit dürften bei älteren Tieren größere Mengen an 20S Proteasomen verloren gegangen sein als bei jungen Tieren, was die hier festgestellte Abnahme der Menge gereinigter 20S Proteasomen von jung nach alt erklären könnte (siehe 3.2.2). Ein Merkmal alternder Zellen sind Ansammlungen Lipofuscin-enthaltender Proteinaggregate, die durch Einschluss von beschädigten Proteinen und von nicht abgebauten Abfallprodukten die Lebensfähigkeit der Zelle gewährleisten könnten (Schmucker and Sachs, 2002). Eine solche Aggregation von Proteinen, von der auch 20S Proteasomen betroffen sein könnten, könnte auch ein Grund für die im Alter abnehmende Proteasomen-Menge sein.

Durch die in der vorliegenden Arbeit angewandte chromatographische Reinigung von 20S Proteasomen wurden drei verschiedene Subpopulationen aus den Lebern von 2, 8 und 23 Monate alten Ratten isoliert (3.2.1). Die dritte Subpopulation ist scheinbar fester mit anderen Proteinen der Zellen assoziiert und konnte nur in sehr geringen Mengen

gereinigt werden (Abb. 37). Es könnte sich auch um Reste ehemaliger 26S/30S- oder Hybrid-Proteasomen-Komplexe handeln, da noch einige 19S Regulatorproteine in dieser Subpopulation nachgewiesen wurden. Aufgrund von strukturellen Modifikationen könnten die Komplexe die Reinigung überstanden haben ohne zu zerfallen.

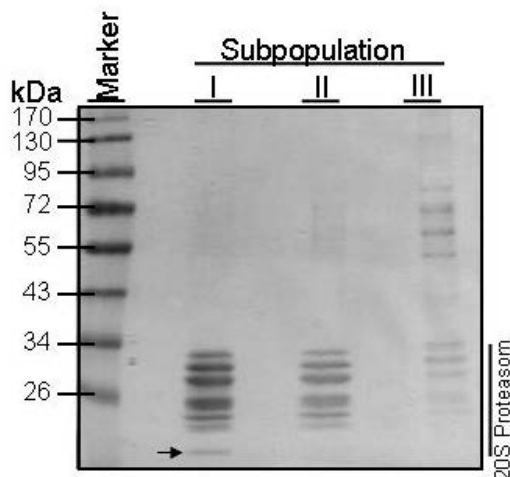


Abb. 37: Sub I – III: Subpopulation I und II wiesen einen hohen Reinheitsgrad auf, Sub III zeigte Verunreinigungen zwischen 55 und 72 kDa. Es könnte sich um 19S Bestandteile handeln. Die abgesetzte Proteinbande von 23 kDa (Abb. 6, Pfeil) in Subpopulation I deutet auf die Präsenz von $\beta 1i$ hin.

Da 20S Proteasomen aus Hepatocyten nicht in Subpopulationen unterteilt werden konnten (siehe 3.5), scheint die Grundlage für ihre Trennbarkeit nicht auf einer kompartimentspezifischen Lokalisation innerhalb der Zellen zu beruhen. Es lässt sich nicht ausschließen, dass Sub I, II und III aus den verschiedenen Zellen der Leber stammen, denn Proteasomen wurden in verschiedenen Leberzelltypen wie Hepatocyten, Kupffer-Zellen und Endothelzellen, nachgewiesen (Rivett et al., 1992; Tanaka et al., 1986). Unabhängig vom Ausgangsgewebe lassen sich 20S Proteasomen in drei Subpopulationen unterteilen (Kloss et al., 2009). Obwohl die Sub I sowohl in Rattenleber, als auch in Rattenherz, aus intermediären 20S Proteasomen mit einem hohen Anteil an Immununtereinheiten besteht (siehe 3.2.3), ließen sich ansonsten keine Gemeinsamkeiten in der Untereinheitenkonfiguration und der spezifischen Aktivitäten der Subpopulationen verschiedener Gewebe feststellen. Ausserdem konnten keine Unterschiede zwischen den Subpopulationen bezüglich der nicht-katalytischen proteasomalen Untereinheiten festgestellt werden. Auch war deren Verteilungsmuster in Proteasom-Subpopulationen aller untersuchten Altersstufen konstant.

Die Größe der Hepatocyten sowie ihrer Organellen nimmt in männlichen Fischer 344 Ratten bis in das Erwachsenenalter (19 Monate) bis zu 60% zu, sinkt aber mit zunehmendem Alter wieder auf Volumina, die man auch in Zellen junger Tiere findet

(Schmucker, 1990, 2005). In der Periode der Zellvolumenzunahme wurde eine bis zu 55% verlangsamte Rate der Protein-Synthese gemessen (Birchenall-Sparks et al., 1985). Da dennoch im gleichen Zeitraum eine Zunahme des Proteingehalts ($\text{mg}/10^6$ Zellen) um 55% beobachtet wurde, kann das nur auf einer entsprechend parallel verlaufenden Verringerung der Proteinabbaurate beruhen. Insofern ist die in der vorliegenden Arbeit beobachtete niedrigere proteasomale Aktivität im Lebergewebe 8 Monate im Vergleich zu 2 Monate alten Ratten erklärlich. (3.1 und 3.2; Breusing et al., 2009; Dasuri et al., 2009). Mit weiter zunehmendem Alter der Ratten verändern sich Leberzellvolumen und Proteasom-Aktivität weiterhin gegenläufig: das Zellvolumen verringert sich wieder auf den Wert, der bei jungen Tieren gemessen wurde (Schmucker, 1990, 2005), während die Proteasomaktivität wieder etwa auf die Werte ansteigt, die in 2 Monate alten Ratten gemessen wurden. Zieht man Daten über proteasomale Aktivitäten in humanen Hautzellen vergleichend heran, wäre ein weiterer Anstieg der proteasomalen Aktivität in Leberzellen zu erwarten, wenn noch ältere als 23 Monate alte Ratten für unsere Untersuchungen verwendet worden wären; denn in Hautzellen 100 Jähriger wurden höhere Aktivitäten gemessen als in denen von Spendern im Alter von 28 – 80 Jahren (Chondrogianni and Gonos, 2008). Die erhöhte Aktivität der gereinigten 20S Proteasomen aus Lebergewebe von Ratten im Alter von 23 Monaten ist vermutlich zurückzuführen auf eine Zunahme von integrierten Immununtereinheiten (siehe 3.2.3), sowie gleichbleibende oder sinkende Mengen der homologen Standarduntereinheiten (Chondrogianni and Gonos, 2008; Ferrington et al., 2005; Rodriguez et al., 2010). Eine Überexpression der Untereinheit $\beta 5i$ führte in Lymphoblasten und HeLa Zellen zu einer deutlichen Erhöhung der chymotryptischen und tryptischen Aktivität (Gaczynska et al., 1994). Die Induktion der Bildung von intermediären 20S Proteasomen mit erhöhtem Anteil an Immununtereinheiten in Rattenlebern scheint somit ein Mechanismus zur funktionellen Anpassung der Proteasomen an eine altersbedingt-veränderte Umgebung oder veränderte Aufgaben in der Zelle sein.

4.1.2 *In vitro*-Prozessierung von Polypeptidsubstraten durch 20S Subpopulationen

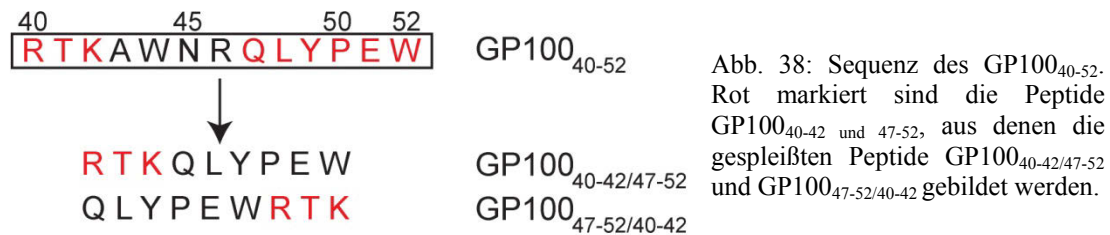
Bei Untersuchungen der Peptidhydrolyse mit Inhibitoren wurde die chymotryptische Aktivität oft als die Abbaugeschwindigkeit bestimmende proteasomale Aktivität beschrieben (Craiu et al., 1997; Lee and Goldberg, 1996; Rock et al., 1994). Die anderen Aktivitäten sollten demnach untergeordnete Rollen spielen. Würde diese Annahme korrekt sein, wäre bei Verdau verschiedener Polypeptidsubstrate mit den proteasomalen Subpopulationen eine abnehmende Hydrolyserate von Sub I bis Sub III aufgrund der abnehmenden spezifischen chymotryptischen Aktivität zu erwarten gewesen (siehe 3.2.4). Bei Abbau des 13mers GP100₄₀₋₅₂ ist diese Hypothese zutreffend. Bei Hydrolyse der längeren Peptidsubstrate GP100₃₅₋₅₇, GP100₂₀₁₋₂₃₀ sowie pp89₁₆₋₄₀ mit der chymotryptisch aktivsten Subpopulation (Sub I) wurde keine erhöhte Abbaurate gemessen. Aufgrund ähnlicher Beobachtungen nahmen Dick und Kollegen (Dick et al., 1991) an, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Substrat-Bindung abseits der aktiven β -Untereinheiten ist, worauf die initiale Spaltung des Peptids mittels der chymotryptischen Aktivität folgt. Die initial entstehenden Peptide würden dann zu den anderen aktiven β -Untereinheiten geleitet und weiter hydrolysiert werden. Kisselev et al beschrieben den Spaltmechanismus des Proteasoms als „*bite-chew*“-Modell (Kisselev et al., 1999): Durch Bindung des zu spaltenen Peptids an die $\beta 5$ -Untereinheit wird die caspaseähnliche Aktivität des Proteasoms ($\beta 1$) allosterisch aktiviert. Die entstehenden Fragmente inhibieren wiederum die chymotryptische Aktivität des Proteasoms, bis sie mittels der tryptischen Aktivität ($\beta 2$) weiter prozessiert worden sind und das Innere des proteasomalen Zylinders verlassen haben, so daß neues Substrat an $\beta 5$ binden kann. Wahrscheinlich ist, dass das Substrat an eine sog. „*modifier site*“ abseits der katalytischen Zentren sowie gleichzeitig an eines der katalytischen Zentren (*two-site modifier*) bindet (Schmidtke et al., 2000). Geschwindigkeitsbestimmend wäre nach diesem Modell die Bindung von Peptiden an die „*modifier site*“. Der Abbau der Polypeptidsubstrate GP100₃₅₋₅₇, GP100₂₀₁₋₂₃₀ und pp89₁₆₋₄₀ wird in Übereinstimmung mit diesen Modellen durch die erhöhte caspaseähnliche Aktivität der 20S Proteasomen aus Sub II gegenüber denen der Sub I beschleunigt (3.2.4). Sub III, bei der sehr niedrige spezifische Aktivitäten mit

fluorogenen Substraten gemessen wurden, zeigen auch die niedrigsten Abbauraten dieser Polypeptide.

Die Hydrolyserate von Peptidsubstraten lässt sich nicht nur durch die spezifischen proteasomalen Aktivitäten, sondern auch durch den Gehalt an Immun- und Standarduntereinheiten des 20S Proteasoms erklären (Kuckelkorn et al., 1995). Die Schnittpräferenzen von Standard- und Immunproteasomen unterscheiden sich deutlich (Strehl et al., 2008; Toes et al., 2001). In Abhängigkeit des verwendeten Substrates ist eine erhöhte Abbaugeschwindigkeit und daraus folgend schnelle Spaltfragmentbildung durch Immunproteasomen zu beobachten (3.2.4; Anhang A4). Die Hydrolyseraten für die Peptidsubstrate GP100₃₅₋₅₇, GP100₂₀₁₋₂₃₀ und pp89₁₆₋₄₀ durch Sub I und II sind nicht signifikant unterschiedlich. Da beide Subpopulationen die Immununtereinheit $\beta 5i$ enthalten (3.2.3), sie sich aber deutlich bezüglich des $\beta 1i$ -Gehalts unterscheiden, scheint diese Untereinheit für die Abbaugeschwindigkeit nicht entscheidend zu sein.

Die Hydrolysegeschwindigkeit von Peptiden durch 20S Proteasomen können auch durch Assoziation des Proteasom-Aktivators PA28 mitbestimmt werden. Durch die Bindung des Aktivators an das 20S Proteasom kommt es zur Öffnung der α -Pore und des Substrat-Kanals in das Proteasom (Rechsteiner and Hill, 2005) und in Folge dessen zu einem erhöhten Substratumsatz (3.4.4). Darüber hinaus ist nach PA28-Assoziation eine Erhöhung der Bildungsrate von Peptiden in Folge von Doppelschnitten nachweisbar (Dick et al., 1996). Das Schnittmuster wird durch PA28 nicht verändert, unterschiedliche Peptid-Bildungsraten zeigen sich in Folge der erhöhten Abbaugeschwindigkeit (3.4.4, Hydrolyse von GP100₄₀₋₅₂) bzw. der Verlagerung der Schnittpräferenzen. Bei Hydrolyse des GP100₄₀₋₅₂ wurden nach Assoziation von PA28 an Sub I und II in Folge der erhöhten Abbauraten auch die Peptide GP100₄₀₋₄₂ und GP100₄₇₋₅₂ mit höherer Geschwindigkeit gebildet (Anhang, Abb. A9).

Über die *in vivo* Funktion von PA28 gibt es verschiedene Hypothesen. Zusammen mit dem Hitzeschockprotein HSP90 könnte es die Reparatur falsch gefalteter Proteine unterstützen (Minami et al., 2000). Eine weitere wichtige Rolle scheint PA28 bei Bildung von Peptiden zu spielen, die mittels MHC Klasse I auf der Zelloberfläche präsentiert werden (de Graaf et al., 2011; Krüger et al., 2003; Rechsteiner and Hill, 2005; Sijts and Kloetzel, 2011; Whitby et al., 2000). Diese werden im 20S Proteasom nicht nur auf konventionellem Weg durch die Spaltung eines Peptidsubstrates generiert, sondern können im 20S Proteasom auch aus zwei durch proteasomale Spaltung generierten Vorläuferpeptiden zusammengesetzt werden.



Posttranslationales Peptidspleißen mittels Proteasomen wurde bereits 2004 beschrieben (Hanada et al., 2004; Vigneron et al., 2004). Ein durch Transpeptidierung gebildetes Peptid wird bei Prozessierung des melanosomalen Proteins GP100₄₀₋₅₂ aus den Peptide GP100₄₀₋₄₂ und GP100₄₇₋₅₂ gebildet (GP100_{40-42/47-52}; siehe Abb. 38 und 3.4.4) und löst eine CTL-Antwort schon in sehr geringen Konzentrationen aus (Vigneron et al., 2004). Warren et al konnten zeigen, dass in der Ausgangssequenz nicht benachbarte Peptidfragmente auch in umgekehrter Reihenfolge (GP100_{47-52/40-42}; siehe Abb. 38 und 3.4.4) verbunden werden können (Warren et al., 2006). Das kann bedeuten, dass neben der Transpeptidierung ein zweiter Spleißmechanismus im Proteasom nachweisbar ist, bei dem das gebildete Acyl-Enzym-Intermediat hydrolysiert und im Anschluss mit einem zweiten Fragment mittels Kondensation verbunden wird.

Die Bildungsrate der gespleißten Peptide ist abhängig von der Schnittfrequenz des Proteasoms, der Peptidsequenz sowie der Bildungsrate des an der Spleißreaktion beteiligten Peptids, das in geringerer Menge vorhanden ist (Mishto et al., 2012). Da keine Unterschiede bei der Bildung der Peptide GP100₄₀₋₄₂ und GP100₄₇₋₅₂ bei Abbau des 13mers GP100₄₀₋₅₂ durch Sub I und II detektierbar waren, wurden auch keine unterschiedlichen Bildungsrate der gespleißten Peptide GP100_{40-42/47-52} und GP100_{47-52/40-42} gemessen (3.4.4). Standardproteasomen generieren GP100_{40-42/47-52} effektiver als Immunproteasomen (Dalet et al., 2011). Der Gehalt der Immununtereinheit β 1i, die in 20S Proteasomen der Sub I, jedoch nicht in 20S Proteasomen der Sub II enthalten ist, hat keinen Einfluss auf die Bildungskinetik der untersuchten Fragmente. Die Assoziation des Proteasomaktivators PA28 hingegen führt zu einer Veränderung des Bildungsverhältnisses der beiden gespleißten Peptide. Die Menge des gebildeten Kondensationsproduktes GP100_{47-52/40-42} nimmt unter dem Einfluss des PA28 ab, während die Menge des Transpeptidierungsproduktes GP100_{40-42/47-52} deutlich zunimmt. Der entscheidende Faktor für die Bildung der Fragmente scheint die Abbaugeschwindigkeit des Substrates GP100₄₀₋₅₂ zu sein. Bei hohen Umsatzraten

verbleiben die Peptide nicht lange genug im 20S Kernkomplex um zu kondensieren, durch die erhöhte Fragmentbildung kann die Transpeptidierungsreaktion jedoch ungehindert stattfinden und die Menge des gebildeten gespleißten Peptids erhöht sich entsprechend dem erhöhten Substratumsatz.

4.2.1 Zusammensetzung der Proteasom-Populationen gereinigt aus Rattenleber im Vergleich zu 20S aus humaner Leber und Hepatocyten

Subpopulationen setzen sich aus Proteasom-Subtypen zusammen, die sich bezüglich der spezifischen Aktivitäten und Untereinheitenstöchiometrie unterscheiden lassen. Die zelluläre Verteilung der Subtypen konnte bisher nicht analysiert werden. Um dennoch einen gewissen Einblick in den Ursprung der proteasomalen Subtypen zu erhalten, wurde die humane Hepatocyten-Zelllinie HUH7 stressfrei kultiviert. Hepatocyten machen etwa 80% des Lebergewebes aus. Bei Präparation von 20S Proteasomen aus diesen Zellen konnten keine Subpopulationen voneinander getrennt werden (3.5.1), die 20S Proteasomen enthalten keine Immununtereinheiten und weisen eine sehr hohe spezifische caspaseähnliche Aktivität auf (3.5.1 und 3.5.2). Diese Befunde entsprechen Beobachtungen in human-foetalem Lebergewebe, in dem ebenfalls keine Immunproteasomen nachgewiesen werden konnten. Erst nach der Geburt wurden Immunproteasomen durch inflammatorische Stimuli gebildet (Vasuri et al., 2010). Im Lebergewebe werden sowohl in Lebergewebe Erwachsener wie auch im Rattenlebergewebe ausschließlich Intermediär- und Immunproteasomen gebildet.

Die 20S Proteasomen der Hepatocytenzelllinie HUH7 waren in drei Subtypen trennbar (3.5.3). Dieses Subtypenspektrum ähnelt dem Subtypenmuster aus HeLa-Zellen, die stressfrei kultiviert wurden. Inkubation dieser Zellen mit IFN γ verändert das Subtypenmuster und es werden Proteasom-Subtypen des intermediären Typs exprimiert (Klare et al., 2007). Die Auswirkung, die das Kultivieren von HUH7 Zellen in Anwesenheit von IFN γ auf das Subtypenspektrum haben würde, wurde hier nicht untersucht. Es wurde aber bereits gezeigt, dass im Lebergewebe über den IFN γ Signalweg, ausgelöst z.B. durch Virus oder Bakterien-Infektionen, ein Austausch von Standard- durch Immunproteasomen erfolgt (Khan et al., 2001; Strehl et al., 2005).

Entsprechend den Ergebnissen der Subpopulationsanalyse in Lebergewebe von Ratten weisen Subtypen der Sub I im Vergleich zu Subtypen der Sub II erhöhte chymotryptische sowie verminderte caspaseähnliche Aktivität auf (3.3.2), eine Eigenschaft die auch bei den entsprechenden Subtypen aus Rattenherzen (Kloss et al., 2009) gefunden wurde. Der Anteil der Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ in Subtypen der Sub I ist im Vergleich zu den Standarduntereinheiten $\beta 1$ und $\beta 5$ sehr hoch (siehe 3.3.3). Proteasomen dieser Zusammensetzung sind in humanen embryonalen Lungenzellen wie auch in HeLa-Zellen mit dem glatten ER und dem *cis*-Golgi assoziiert, was über den mit der ER Membran assoziierten TAP-Transporter zu einer effizienten Bildung und Präsentation von Peptiden via MHC Klasse I führen könnte (Brooks et al., 2000). Die Subtypen der Sub II enthalten wesentlich höhere Anteile an Standarduntereinheiten, $\beta 1i$ ist mittels Immun-Blottings nicht oder nur in sehr geringem Maß nachweisbar (3.3.3). Diese Untereinheitenkonfiguration wurde für Proteasomen cytosolischen Ursprungs nachgewiesen (Brooks et al., 2000). Die Subtypenpools der Sub III weisen sehr niedrige spezifische Aktivitäten auf, ähnliche Beobachtungen wurden bei Analyse von Kernproteasomen gefunden (Rodriguez et al., 2010). Die Konstanz des Trennungsmusters der Proteasom-Subpopulationen und ihrer Subtypen aus verschiedenen Geweben und verschiedener Spezies untermauert die Hypothese des gleichen zellulären kompartimentspezifischen Ursprungs dieser Proteasom-Subpopulationen. Es ist aber weiterhin nicht auszuschließen, dass die Herkunft der Proteasomen aus verschiedenen Leberzellen wie Hepatocyten, Kupffer- und Stellatumzellen, zur Diversität des 20S Proteasom-Subtypen-Spektrums beiträgt. In Kollaboration mit Francesco Vasuri und Kollegen (Universität Bologna) wurde mittels immunhistologischer Methoden versucht, die Verteilung der Immununtereinheiten-enthaltenden Proteasomen in Rattenlebergewebe zu lokalisieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass Proteasomen mit $\beta 1i$ und $\beta 5i$ Untereinheiten in Hepatocyten, Kupffer- und Sternzellen lokalisiert sind (Daten nicht gezeigt).

4.2.2 Proteolytische Prozessierung von Peptidsubstraten durch Subtypen *in vitro*

Über die biologische Relevanz der zahlreichen proteasomalen Subtypen gibt es verschiedene Theorien. Alle Proteasomen-Typen sind an der Bildung von MHC Klasse

I Epitopen beteiligt. Die Effizienz der Epitopgenerierung ist jedoch abhängig von der Hydrolyserate sowie der Schnittfrequenz des Proteasoms und variiert sowohl bei verschiedenen Substraten als auch bei verschiedenen Proteasom-Typen (Morel et al., 2000; Sijts et al., 2000a; Strehl et al., 2008; Toes et al., 2001). Sogar für verschiedene Intermediär-Subtypen wurden deutliche Unterschiede bei Abbau des aus dem MCMV IE stammenden 25mers pp89₁₆₂₋₁₈₅ gemessen werden (Dahlmann et al., 2000). Intermediärproteasomen mit einem hohen Anteil an Immununtereinheiten hydrolysierten dieses Substrat sehr schnell. Im Gegensatz dazu konnten keine Unterschiede beim Abbau von sequenzverwandten Oligo-Peptiden aus dem Tumorantigen GP100₄₀₋₅₂ und ₃₅₋₅₇ (Anhang Abb. A6) gemessen werden. Bei Abbau des GP100₂₀₁₋₂₃₀ hingegen wurden hohe Abbauraten mit Subtypen gemessen, die hohe caspaseähnliche Aktivität und geringe Mengen der integrierten Immununtereinheit β 1i aufweisen (siehe 3.3.3, 3.4.1). Ähnliche Resultate wurden bei Analyse der Hydrolyse des GP100₂₀₁₋₂₃₀ durch die aus humaner Leber isolierten Subtypen beobachtet (3.5.4). Auch wenn sich die Subtypenspektren der Ratten- und Humanleber deutlich unterscheiden, so zeigten sich doch ähnliche spezifische Aktivitäten und proteolytische Eigenschaften der Subtypen. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Subtypen von Menschen und Ratten wurde bezüglich des Anteils der Immununtereinheit β 5i festgestellt, der in humanen Proteasom-Subtypen deutlich erhöht war. Dies kann z.B. durch inflammatorischen Stress, dem der Mensch permanent im Gegensatz zu der relativ hygienischen Umwelt der Laborratten ausgesetzt ist, erklärt werden. Der Anteil des β 5i im Proteasom-Zylinder scheint jedoch keinen großen Einfluss auf die Hydrolyserate des GP100₂₀₁₋₂₃₀ zu haben, der Einfluss auf den Abbau anderer Substrate bleibt zu analysieren.

Basierend auf der QME-Methode lässt sich die Schnitthäufigkeit verschiedener Proteasom-Subtypen bezüglich bestimmter Peptidbindungen errechnen (Mishto et al., 2012). Sie unterscheidet sich zwischen den Subtypen der ersten und der zweiten Subpopulation (3.4.2). Durch Integration von Immununtereinheiten in 20S Proteasomen erhöht sich die Affinität des Proteasoms zu Schnittstellen nach hydrophoben und basischen Resten (Toes et al., 2001); entsprechend der hohen chymotryptischen Aktivität präferieren Subtypen I.2 – I.4 bei Abbau des GP100₂₀₁₋₂₃₀ die Schnittstelle nach Leucin (Position 222). Die Schnittpräferenz für die Positionen 209, 213 und 217 (Isoleucin und Valin) sind im Vergleich zu den Schnittpräferenzen der Subtypen II.2 – II.4 deutlich niedriger, obwohl auch diese Aminosäuren hydrophobe Reste aufweisen

(Abb. 39). Für die Schnittstelle V₂₁₉ und L₂₂₅ sind keine Präferenzen erkennbar (nicht gezeigt).

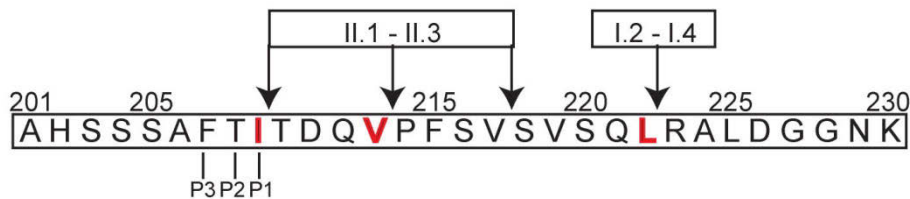


Abb.39: Sequenz des GP100₂₀₁₋₂₃₀. Markiert sind die hoch frequentierten Schnittstellen der Subtypen I.2 – I.4 und II.1 – II.3. Entscheidend für die Schnitthäufigkeit/Spezifität sind die Aminosäuren von P1-P3 gekennzeichnet für Schnittstelle GP100₂₀₉.

Da nicht nur die Aminosäure in Position P1 (Carboxylgruppendonator der zu hydrolysierenden Peptidbindung) die Spaltspezifität beeinflusst, sondern vor allem auch Aminosäuren in P3 und P4 (Groll et al., 2002; Harris et al., 2001), scheint das Phenylalanin in P3 der Schnittstelle die Schnitthäufigkeit durch Proteasomen mit niedrigem β 1i-Gehalt zu erhöhen. Alle präferierten Schnittstellen liegen C-terminal der verzweigtkettigen Aminosäuren (Leucin, Valin, Isoleucin). Neben den drei bekannten spezifischen proteasomalen Aktivitäten (chymotryptisch, tryptisch, caspaseähnlich) wurde vermutet, dass das Proteasom auch Schnitte bevorzugt nach verzweigtkettigen (BrAAP Aktivität) und kleinen, neutralen Aminosäuren katalysiert (SNAAP Aktivität; (Orlowski et al., 1993)). Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht klar, ob die sog. BRAAP-Aktivität des Proteasoms eigenständig zu betrachten ist oder ob sie durch das katalytische Zentrum für die caspaseähnliche Aktivität katalysiert wird (Kisselev et al., 2006). Würden die caspaseähnlich- und die BRAAP-Aktivität durch die gleiche β -Untereinheit katalysiert werden, wäre es möglich, dass die Subtypen II.2-II.4 neben der erhöhten caspaseähnlichen- auch erhöhte BRAAP-Aktivität zeigen. Schnitte C-terminal der Aminosäuren Leucin, Valin und Isoleucin würden von diesen Subtypen besonders häufig katalysiert werden, was zu schnellem Abbau von Substraten (wie das hier verwendete GP100₂₀₁₋₂₃₀) führen würde. Die so entstehenden Peptide mit hydrophoben C-terminalen Enden weisen hohe Affinität zur Bindung an TAP und MHC Moleküle auf und stellen somit favorisierte MHC Klasse I präsentierte Epitope dar.

Durch Analyse der Bildungsraten von Spaltprodukten in den ersten Minuten der Hydrolyse von Substraten können die initial gebildeten Fragmente identifiziert werden. Dahlmann et al haben gezeigt, dass immunähnliche Subtypen aus Rattenmuskel das pp89₁₆₋₄₀ schneller abbauen und ein anderes Schnittmuster zeigten als standardähnliche

Subtypen (Boes et al., 1994; Dahlmann et al., 2000). Bei Abbau des GP100₂₀₁₋₂₃₀ werden verschiedene Peptide sehr schnell gebildet. Anhand der Schnitthäufigkeiten lässt sich zeigen, dass in Abhängigkeit des Vorhandenseins der Untereinheit $\beta 1i$ in den Subtypen einige Peptide mit unterschiedlicher Präferenz gebildet werden (3.4.2; 3.5.4). Die Subtypen II.2 – II.4, die nur marginale Mengen $\beta 1i$ enthielten, präferierten die Hydrolyse der Peptidbindung nach I₂₀₉, V₂₁₃ und V₂₁₇, die Rattensubtypen I.2 – I.4 mit hohem $\beta 1i$ -Anteil präferierten die Schnittstelle nach L₂₂₂ (siehe Abb. 37). Zusätzlich zeigte sich eine Korrelation zwischen Abbaugeschwindigkeit und Schnittpräferenz: von Subtyp I.2 (sehr langsamer Abbau) bis Subtyp II.3 und II.4 (sehr schneller Abbau) verlagert sich die Hauptschnittstelle von L₂₂₂ (Bildung von GP100₂₀₁₋₂₂₂ und GP100₂₂₃₋₂₃₀) nach V₂₁₃ (Bildung von GP100₂₀₁₋₂₁₃ und GP100₂₁₄₋₂₃₀) und V₂₁₇ (Bildung von GP100₂₀₁₋₂₁₇ und GP100₂₁₈₋₂₃₀). Alle beobachteten Unterschiede waren rein kinetischer Natur; prinzipiell hydrolysierten alle Subtypen die gleichen Peptidbindungen in den untersuchten Substraten.

Auch durch Peptidspleißen im Proteasom entstehen mögliche MHC Klasse I Epitope (3.4.4; Mishto et al., 2012). Die prozentuale Bildung von gespleißten Peptiden bezogen auf die Gesamtmenge aller gebildeten Peptide ist mit den Subtypen II.1 – II.3 gegenüber den Subtypen I.3 und I.4 erhöht (Tab. 3). Trotz der niedrigeren Abbaugeschwindigkeit konnte dennoch eine effektivere Bildung der Spleißpeptide GP100_{201-207/201-207} sowie GP100_{201-209/201-207} durch Subtypen der Sub I (vor allem I.2) im Vergleich zu Subtypen der Sub II gemessen werden. Das führt bei Subtyp I.2 zu der gleichen Menge gebildeter Spleißpeptide wie in Subtypen der Sub II (Tab.3). Ob dafür der größere Gehalt an den Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ in Sub I im Vergleich zu Sub II verantwortlich ist, ist unklar.

<i>20S Proteasom Subtyp</i>	<i>Spleißpeptide/Gesamtmenge aller Peptide (%)</i>
I.2	2,3 ± 1,2
I.3	1,9 ± 0,7
I.4	1,3 ± 0,6
II.1	2,5 ± 1,2
II.2	2,2 ± 0,9
II.3	2,5 ± 1,3

Tab.3: Relative Menge gespleißter Peptide in Bezug auf alle durch Proteasom-Subtypen gebildeten Peptide. Ermittelt durch den QME-Algorithmus, der auf MS-Analysen angewendet wurde. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± SD

4.3 Unterschiedliche Eigenschaften von Proteasom-Subtypen in Abhängigkeit des Alters

4.3.1 Veränderungen von Subtypen in Abhängigkeit des Alters

Während des Alterungsprozesses treten in allen Organen des Körpers molekulare und morphologisch sichtbare Veränderungen auf. Neben Veränderungen der Proteinhomöostase treten im Alter vermehrt Schädigungen zellulärer Strukturen durch oxidativen Stress auf. In vielen Zellen sind Ansammlungen von Proteinaggregaten (Johnston et al., 1998) sowie Schädigungen der mitochondrialen DNA zu beobachten (Sanz et al., 1997). Obwohl die Funktion der Leber gegenüber Altersschädigungen relativ resistent zu sein scheint, treten auch in diesem Organ signifikante Veränderungen auf. Die Organmasse nimmt im Alter um bis zu 35% ab, die Fließgeschwindigkeit des Blutes im Organ kann um bis zu 40% reduziert sein und es kommt zu Akkumulation von Lipofuscin in den Hepatocyten (Zeeh and Platt, 2002). Bis ins Erwachsenenalter konnte eine Zunahme des Mitochondrien-, ER- und Lysosomenvolumens in diesen Zellen sowie eine Zunahme polyploider Hepatocyten nachgewiesen werden (Schmucker, 1990, 2005). Im Alter treten vor allem zwei Lebererkrankungen auf. Neben zunehmendem Auftreten hepatocytischer Carcinome (HCC) wurden bei über 75 jährigen Personen vermehrt chronische Hepatitis-C Infektionen diagnostiziert, die durch Verschreibung von Interferon α -haltigen Medikamenten behandelt werden (Floreani, 2007). Da INF γ -Stimulation zur verstärkten Bildung von Immunproteasomen führt, könnten Proteasomen eine wichtige Rolle bei der Behandlung dieser Krankheiten spielen. Personen dieser Altersstufe zeigen durch Immundefizienz jedoch häufig verminderte Reaktionen auf die Behandlung mit solchen Medikamenten, daher ist die hochauflösende Analyse der Veränderung der Funktionen von Proteasomen in der Leber essentiell zu Verbesserung der Behandlungen dieser Krankheiten.

Sowohl in dieser Arbeit als auch in früheren Publikationen konnten altersabhängige Veränderungen der proteasomalen Aktivität in Rattenleber nachgewiesen werden (Conconi et al., 1996; Hayashi and Goto, 1998; Shibatani et al., 1996). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten proteasomalen Subpopulationen aus Lebern 2, 8 und

23 Monate alter Ratten zeigten für jede Altersstufe eine spezifische Untereinheiten-Stöchiometrie und Aktivität (3.2.2, 3.2.3, 4.1). Darüber hinaus wurden die Abbauraten verschiedener Peptidsubstrate im Altersvergleich analysiert (3.2.4). Während die Abbaugeschwindigkeit zweier sequenzverwandter Substrate GP100₄₀₋₅₂ und 35-57 durch die drei Subpopulationen keine altersabhängigen Veränderungen zeigte, wurden solche sehr wohl beim Abbau des pp89₁₆₋₄₀ sowie des GP100₂₀₁₋₂₃₀ beobachtet. Die alterabhängige Zunahme an Immununtereinheiten in Sub I geht einher mit einer erhöhten Abbaugeschwindigkeit.

Um die altersabhängigen Veränderungen der Subpopulationen zu verstehen (4.3.4), wurden die proteasomalen Subtypen, aus denen sich die Subpopulationen zusammensetzten, getrennt und einzeln analysiert. Während die fünf Subtypen (I.1 – I.5) der Sub I in allen untersuchten Tieren im gleichen Verhältnis vorhanden waren, nahm die Menge der Subtypen II.1 und II.2 im Vergleich zu den Subtypen II.3 – II.5 im Alter ab (3.3.1). Auch in der dritten Subpopulation wurden altersabhängige Subtypenspektren gefunden, die Proteinmenge war jedoch zu gering, um die einzelnen Subtypen dieser Population zu analysieren. Die Trennung von Proteasom-Subtypen wurde durch eine Kombination von Anionenaustausch- und hydrophober Interaktions-Chromatographie durchgeführt. Daher müssen sich die Subtypen in ihrer Oberflächen-Ladung und –Hydrophobizität unterscheiden. Da in der Untersuchung von Dahlmann et al (2000) bereits Standard-, Intermediär- und Immunproteasomen mittels hochauflösender Anionenaustausch-Chromatographie getrennt werden konnten, ist der Gehalt an Immununtereinheiten offenbar mitbestimmend für die Oberflächenladung der 20S Proteasomen. Interessanterweise wurden die meisten Austausche von Aminosäuren zwischen dem Standard- und Immunproteasom auf deren Oberfläche gefunden (Huber et al., 2012). Die Existenz einer so großen Anzahl von Subtypen innerhalb der drei großen Proteasom-Populationen kann aber wohl nur durch weitere Modifikation der Proteasom-Untereinheiten erklärt werden. In 20S-Proteasom-Untereinheiten sind verschiedene posttranslationale Modifikationen gefunden worden (Bose et al., 2004; Mason et al., 1996; Uttenweiler-Joseph et al., 2008; Zong et al., 2008). In Proteasomen aus Lymphocyten sind mit zunehmendem Alter der Spender sowohl eine verstärkte Phosphorylierung der Untereinheit $\alpha 7$ als auch eine zunehmende Ubiquitynylierung der Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 5$, $\beta 5i$ und $\beta 7$ entdeckt worden (Carrard et al., 2003). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der Proteasom-Subtypen mittels 2D-PAGE zeigte jedoch keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den Subtypen

hinsichtlich Ladung und Größe ihrer Proteasom-Untereinheiten. Die hier erreichte Auflösung der Untereinheiten ist allerdings nicht so gut wie in früher veröffentlichten Publikationen (Bousquet-Dubouch et al., 2008; Schmidt et al., 2006; Wang et al., 2011). Mittels Immunblotting nach 1D Gelelektrophorese konnte jedoch gezeigt werden, dass der Anteil der Immununtereinheiten in Subtypen I.2 – I.4 in 8 und 23 Monate alten Ratten höher ist als in den entsprechenden Subtypen 2 Monate alter Tiere. Auch tryptische und chymotryptische Aktivitäten aller Subtypen der Sub I und II sind im Alter erhöht, die caspaseähnliche Aktivität zeigte einen transienten Anstieg im Alter von 8 Monaten. Der Abfall der proteasomalen Caspaseaktivität im Alter ist typisch für Leberproteasomen (Anselmi et al., 1998; Conconi et al., 1996; Hayashi and Goto, 1998; Shibatani et al., 1996) und spricht für eine altersabhängige Zunahme immunähnlicher Subtypen. Mittels der Addition der Proteinmengen der Einzelsubtypen ließ sich zeigen, dass die Gesamtmenge der standardähnlichen Subtypen (II.1 – II.3 sowie III.1 und III.2) im Alter deutlich sank, während die Gesamtmenge der immunähnlichen Subtypen I.2 – I.4 anstieg (3.3.1). Auch Hayashi et al haben eine Abnahme der Proteasom-Menge in 8 Monate alten Ratten gemessen (Hayashi and Goto, 1998). Das heißt, die mit zunehmendem Alter abnehmende Proteasom-Gesamtmenge geht einher mit zunehmender Konzentration an Intermediär- bzw. Immunproteasomen. Da die Expression von Immununtereinheiten nicht nur durch Immun-Stimuli induzierbar ist, sondern allgemein eine Antwort auf Zell- bzw. Organstress ist (Krüger and Klotzel, 2012), könnte die mit steigendem Alter zunehmende Bildung von Immun-Proteasomen eine Reaktion auf erhöhte oxidative Schädigung der Zell-Proteine sein, da diese durch Immunproteasomen schneller abgebaut werden als durch konstitutive Proteasomen (Seifert et al., 2010).

4.3.2 Veränderte proteolytische Prozessierung von Peptiden durch Subtypen in Abhängigkeit des Alters

Da bekannt ist, daß im Alter die Bildung von Lebercarcinomen erhöht ist (Floreani, 2007), schien es interessant, die proteasomale Prozessierung von Tumorantigenen sowie die Bildung möglicher MHC Klasse I Epitope in Abhängigkeit des Alters der Tiere zu untersuchen. Bekanntermaßen werden verschiedene Epitope ausschließlich von Immun-

bzw. Standardproteasomen hergestellt (Dalet et al., 2011; Sijts et al., 2000b). Einige Epitope werden aber ausschließlich von proteasomalen Subtypen des intermediären Typs mit der Untereinheitenkonfiguration $\beta 1i\text{-}\beta 2\text{-}\beta 5i$ und $\beta 1\text{-}\beta 2\text{-}\beta 5i$ generiert (Guillaume et al., 2010). Dabei scheint weder die Höhe der chymotryptischen Aktivität noch die der caspaseähnlichen Aktivität von Bedeutung zu sein, sondern allein die Unterdrückung eines Schnittes, der die Epitope der Tumorantigene Mage A3 bzw. Mage A10 zerstört. Für den Abbau der Tumorantigene GP100₃₅₋₅₇ und 201-230 scheint hingegen neben der chymotryptischen- auch die caspaseähnliche Aktivität und damit einhergehend die Untereinheitenkonfiguration der Subtypen entscheidend zu sein. Es zeigt sich eine subtypenspezifische Abbaurate, die sich altersabhängig verändert. In Abhängigkeit vom Alter werden deutliche Unterschiede der proteolytischen Eigenschaften von Subtypen detektiert (3.4). Dabei treten altersabhängige Veränderungen der proteasomalen Spaltspezifität bei längeren Peptidsubstraten mit relativ hohem Anteil hydrophober Reste klarer zu Tage als beim Abbau kurzer Substrate. Während sich die proteolytischen Eigenschaften von Subtypen aus Lebern 2 und 23 Monate alter Ratten ähneln, zeigen Subtypen 8 Monate alter Tiere sowohl bezüglich des Abbaus von GP100₂₀₁₋₂₃₀ (Anhang, Abb. A8), als auch der Bildung von Spaltpeptiden ein anderes Verhalten (nicht gezeigt). Eine ähnliche Beobachtung wurde bei 20S Proteasomen aus Human-Fibroblasten von Chondrogianni et al (2000) beschrieben.

Die Analyse der Epitopbildung mittels proteasomaler Subtypen unterschiedlicher Altersstufen zum Auslösen der Immunantwort, vor allem auch durch Spleißen, ist die Grundlage zum Verständnis der Veränderungen des Immunstatus während des Alterungsprozesses. Obwohl bislang nur drei gespleißte Peptide als MHC Klasse I Epitope identifiziert werden konnten, scheint das proteasomale Spleißen ein immunologisch wichtiger Prozess zu sein, da die auf diese Weise gebildeten Epitope hoch affine HLA-A3 Bindungsmotive sind (Dalet et al., 2010; Hanada et al., 2004; Vigneron et al., 2004; Warren et al., 2006). Verändern sich die proteasomalen Spaltspezifitäten im Alter, könnte auch die Epitopgenerierung mittels Spleißen verändert oder gestört werden und die zum Auslösen der Immunantwort nötigen antigenen Peptide würden nicht mehr gebildet werden. Bei Abbau des GP100₂₀₁₋₂₃₀ mit Subtypen 2 und 23 Monate alter Ratten wurde bei 50%igem Substratabbau die gleiche Menge gebildeter Fragmente und gespleißter Peptide gemessen. Trotz unterschiedlicher spezifischer Aktivitäten und Untereinheiten-Stöchiometrie scheinen sich die

proteolytischen Eigenschaften der 20S Proteasomen dieser Altersstufen in dieser Hinsicht zu gleichen, während Proteasom-Subtypen aus 8 Monate alten Tieren ein abweichendes Verhalten gegenüber diesem Substrat zeigen. Die Veränderung der Untereinheiten-Stöchiometrie in den 20S Proteasomen reicht zur Erklärung dieser Beobachtungen vermutlich nicht aus, auch posttranslationale Modifikationen könnten zu proteolytischen Spezifitätsunterschieden führen. Es ist bekannt, dass posttranslationale Modifikationen sowohl die Assemblierung (Bose et al., 2004) als auch die Halbwertszeit (Cuervo et al., 1995) sowie Aktivitäten des Proteasoms (Zong et al., 2006) beeinflussen. Die Rolle der posttranslationalen Modifikationen sowie des Einflusses von assoziierten regulatorischen Komplexen bezüglich der Antigenprozessierung und des Spleißmechanismus der Subtypen bleiben zu untersuchen.

4.4 Schlussfolgerung

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das Proteasom-System sehr anpassungsfähig ist. In Abhängigkeit vom Alter einer Zelle oder eines Organismus und/oder durch exogene (Stress-)Faktoren wird die Bildung verschiedener Proteasom-Subtypen induziert. So lassen sich in Hepatocyten keine proteasomalen Immununtereinheiten nachweisen, wenn die Zellen stressfrei kultiviert werden (3.5.2). Diese Anpassungsfähigkeit des proteasomalen Systems ist sicher auch eine Ursache für uneinheitliche teils widersprüchliche Ergebnisse, wie sie in der Literatur z.B. hinsichtlich der spezifischen Aktivitäten der Proteasomen, publiziert worden sind. Da die gesamte 20S Proteasom-Population aus mehreren Subpopulationen und die wiederum aus unterschiedlichen Mengen mehrerer Subtypen mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten bestehen, ist die spezifische Aktivität der gesamten 20S Proteasom-Population ist eine komplexe Mischung aus Menge und Aktivität der Einzel-Subtypen. Entsprechend komplex sind die Änderungen einer Proteasomen-Populationen im Alterungsprozess. Während die spezifische chymotryptische Aktivität der Subtypen im Alter steigt (3.2.3 und 3.3.3), verändert sich die Menge der einzelnen Subtypen der Art, dass die Gesamtaktivität der Proteasom-Population bei Vergleich von 2 Mo und 23

Mo nicht signifikant unterschiedlich ist (3.3.2). Im Alter von 8 Mo hingegen ist sie im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Alterstufen signifikant niedriger.

Parallel zu der in Hepatocyten beobachteten altersabhängigen Abnahme des rauen ER und einer verminderter Proteinsynthese (Anantharaju et al., 2002; Schmucker, 1998), nimmt auch die Gesamtmenge der Proteasomen in der Leber im Alter ab. Allerdings erfolgt eine Zunahme der Immun- und Intermediärproteasomen. Heink et al. stellten fest, dass Immunproteasomen verglichen mit Standardproteasomen eine deutlich kürzere Halbwertszeit besitzen (Heink et al., 2005). Das würde bedeuten, dass im Alter schneller Intermediär- und Immunproteasomen gebildet werden, die auch schneller wieder abgebaut werden. Auch im Zentralnervengewebe, das vornehmlich Standardproteasomen enthält, wurde eine altersabhängige Zunahme von Immununtereinheiten nachgewiesen (Baumann et al, noch nicht veröffentlicht). Erst kürzlich wurde publiziert, daß im Hippocampus alter im Gegensatz zu jungen Ratten vornehmlich Immunproteasomen gebildet werden, wenn das Proteasom-System experimentell irreversibel geblockt worden ist (Gavilan et al., 2012). Es scheint somit nicht unwahrscheinlich zu sein, dass die Bildung von Proteasomen mit Immununtereinheiten mit zunehmendem Alter bevorzugt wird. Da sowohl die hier vorgelegten Untersuchungen als auch die Befunde von Baumann et al zeigen, daß die Aktivität der Proteasomen alter Ratten gegenüber ubiquitinierten Polypeptid-Substraten teilweise höher ist als die der jungen, scheint die Schlussfolgerung erlaubt, dass die Veränderungen des Proteasom-Systems eine altersabhängige Anpassung an ein möglicherweise verändertes Angebot von Substratproteinen ist. Dazu gehören nicht zuletzt oxidativ geschädigte Proteine, die mit zunehmendem Alter vermehrt auftreten und durch Immunproteasomen effektiver abgebaut werden können (Seifert et al., 2010). Die hier vorliegenden Untersuchungen zeigen zwar eine Abnahme der Menge an 26S Proteasomen im Lebergewebe mit zunehmendem Alter der Tiere, zukünftige Untersuchungen müssen aber klären, ob die verbleibenden 26S Proteasomen möglicherweise – ähnlich wie teilweise die 20S Proteasomen gegenüber Polypeptid-Substraten – eine gesteigerte Aktivität gegenüber polyubiquitinierten Substraten besitzen.

Literaturverzeichnis

- Ahn, J.Y., Hong, S.O., Kwak, K.B., Kang, S.S., Tanaka, K., Ichihara, A., Ha, D.B., and Chung, C.H. (1991). Developmental regulation of proteolytic activities and subunit pattern of 20 S proteasome in chick embryonic muscle. *J Biol Chem* 266, 15746-15749.
- Aki, M., Shimbara, N., Takashina, M., Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1994). Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem* 115, 257-269.
- Anantharaju, A., Feller, A., and Chedid, A. (2002). Aging Liver. A review. *Gerontology* 48, 343-353.
- Anselmi, B., Conconi, M., Veyrat-Durebex, C., Turlin, E., Biville, F., Alliot, J., and Friguet, B. (1998). Dietary self-selection can compensate an age-related decrease of rat liver 20 S proteasome activity observed with standard diet. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 53, B173-179.
- Arendt, C.S., and Hochstrasser, M. (1999). Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. *Embo J* 18, 3575-3585.
- Bardag-Gorce, F., Oliva, J., Lin, A., Li, J., French, B.A., and French, S.W. (2011). Proteasome inhibitor up regulates liver antioxidative enzymes in rat model of alcoholic liver disease. *Exp Mol Pathol* 90, 123-130.
- Birchenall-Sparks, M.C., Roberts, M.S., Staecker, J., Hardwick, J.P., and Richardson, A. (1985). Effect of dietary restriction on liver protein synthesis in rats. *J Nutr* 115, 944-950.
- Boes, B., Hengel, H., Ruppert, T., Multhaup, G., Koszinowski, U.H., and Kloetzel, P.M. (1994). Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med* 179, 901-909.
- Bose, S., Stratford, F.L., Broadfoot, K.I., Mason, G.G., and Rivett, A.J. (2004). Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *Biochem J* 378, 177-184.
- Bousquet-Dubouch, M.P., Uttenweiler-Joseph, S., Ducoux-Petit, M., Matondo, M., Monsarrat, B., and Burlet-Schiltz, O. (2008). Purification and proteomic analysis of 20S proteasomes from human cells. *Methods Mol Biol* 432, 301-320.
- Breusing, N., Arndt, J., Voss, P., Bresgen, N., Wiswedel, I., Gardemann, A., Siems, W., and Grune, T. (2009). Inverse correlation of protein oxidation and proteasome activity in liver and lung. *Mech Ageing Dev* 130, 748-753.

- Briane, D., Olink-Coux, M., Vassy, J., Oudar, O., Huesca, M., Scherrer, K., and Foucrier, J. (1992). Immunolocalization of a specific type of prosome close to the bile canaliculi in fetal and adult rat liver. *Eur J Cell Biol* 57, 30-39.
- Brooks, P., Murray, R.Z., Mason, G.G., Hendil, K.B., and Rivett, A.J. (2000). Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 352 Pt 3, 611-615.
- Burlet-Schiltz, O., Claverol, S., Gairin, J.E., and Monsarrat, B. (2005). The use of mass spectrometry to identify antigens from proteasome processing. *Methods Enzymol* 405, 264-300.
- Burri, L., Hockendorff, J., Boehm, U., Klamp, T., Dohmen, R.J., and Levy, F. (2000). Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10348-10353.
- Cardozo, C., and Kohanski, R.A. (1998). Altered properties of the branched chain amino acid-preferring activity contribute to increased cleavages after branched chain residues by the "immunoproteasome". *J Biol Chem* 273, 16764-16770.
- Carrard, G., Dieu, M., Raes, M., Toussaint, O., and Friguet, B. (2003). Impact of ageing on proteasome structure and function in human lymphocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 728-739.
- Cascio, P., Call, M., Petre, B.M., Walz, T., and Goldberg, A.L. (2002). Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. *Embo J* 21, 2636-2645.
- Chapiro, J., Claverol, S., Piette, F., Ma, W., Stroobant, V., Guillaume, B., Gairin, J.E., Morel, S., Burlet-Schiltz, O., Monsarrat, B., *et al.* (2006). Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *J Immunol* 176, 1053-1061.
- Chondrogianni, N., and Gonos, E.S. (2008). Proteasome activation as a novel antiaging strategy. *IUBMB Life* 60, 651-655.
- Cogger, V.C., Fraser, R., and Le Couteur, D.G. (2003). Liver dysfunction and heart failure. *Am J Cardiol* 91, 1399.
- Conconi, M., and Friguet, B. (1997). Proteasome inactivation upon aging and on oxidation-effect of HSP 90. *Mol Biol Rep* 24, 45-50.
- Conconi, M., Szweda, L.I., Levine, R.L., Stadtman, E.R., and Friguet, B. (1996). Age-related decline of rat liver multicatalytic proteinase activity and protection from oxidative inactivation by heat-shock protein 90. *Arch Biochem Biophys* 331, 232-240.
- Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65, 801-847.
- Craiu, A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C.F., Fenteany, G., Goldberg, A.L., and Rock, K.L. (1997). Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple

proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J Biol Chem* 272, 13437-13445.

Cuervo, A.M., Palmer, A., Rivett, A.J., and Knecht, E. (1995). Degradation of proteasomes by lysosomes in rat liver. *Eur J Biochem* 227, 792-800.

Dahlmann, B., Kuehn, L., Rutschmann, M., and Reinauer, H. (1985). Purification and characterization of a multicatalytic high-molecular-mass proteinase from rat skeletal muscle. *Biochem J* 228, 161-170.

Dahlmann, B., Ruppert, T., Kuehn, L., Merforth, S., and Kloetzel, P.M. (2000). Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J Mol Biol* 303, 643-653.

Dalet, A., Stroobant, V., Vigneron, N., and Van den Eynde, B.J. (2011). Differences in the production of spliced antigenic peptides by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Eur J Immunol* 41, 39-46.

Dalet, A., Vigneron, N., Stroobant, V., Hanada, K., and Van den Eynde, B.J. (2010). Splicing of distant Peptide fragments occurs in the proteasome by transpeptidation and produces the spliced antigenic peptide derived from fibroblast growth factor-5. *J Immunol* 184, 3016-3024.

Daniels, C.K., Smith, K.M., and Schmucker, D.L. (1987). Asialoorosomucoid hepatobiliary transport is unaltered by the loss of liver asialoglycoprotein receptors in aged rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 186, 246-250.

Dasuri, K., Zhang, L., Ebenezer, P., Liu, Y., Fernandez-Kim, S.O., and Keller, J.N. (2009). Aging and dietary restriction alter proteasome biogenesis and composition in the brain and liver. *Mech Ageing Dev* 130, 777-783.

de Graaf, N., van Helden, M.J., Textoris-Taube, K., Chiba, T., Topham, D.J., Kloetzel, P.M., Zaiss, D.M., and Sijts, A.J. (2011). PA28 and the proteasome immunosubunits play a central and independent role in the production of MHC class I-binding peptides in vivo. *Eur J Immunol* 41, 926-935.

Deol, P., Zaiss, D.M., Monaco, J.J., and Sijts, A.J. (2007). Rates of processing determine the immunogenicity of immunoproteasome-generated epitopes. *J Immunol* 178, 7557-7562.

Dick, L.R., Moomaw, C.R., DeMartino, G.N., and Slaughter, C.A. (1991). Degradation of oxidized insulin B chain by the multiproteinase complex macropain (proteasome). *Biochemistry* 30, 2725-2734.

Dick, T.P., Nussbaum, A.K., Deeg, M., Heinemeyer, W., Groll, M., Schirle, M., Keilholz, W., Stevanovic, S., Wolf, D.H., Huber, R., *et al.* (1998). Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J Biol Chem* 273, 25637-25646.

Dick, T.P., Ruppert, T., Groettrup, M., Kloetzel, P.M., Kuehn, L., Koszinowski, U.H., Stevanovic, S., Schild, H., and Rammensee, H.G. (1996). Coordinated dual cleavages

induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 86, 253-262.

Drews, O., Wildgruber, R., Zong, C., Sukop, U., Nissum, M., Weber, G., Gomes, A.V., and Ping, P. (2007). Mammalian proteasome subpopulations with distinct molecular compositions and proteolytic activities. *Mol Cell Proteomics* 6, 2021-2031.

Driscoll, J., Brown, M.G., Finley, D., and Monaco, J.J. (1993). MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* 365, 262-264.

Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K., and Rechsteiner, M. (1992). Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 267, 22369-22377.

Eleuteri, A.M., Kohanski, R.A., Cardozo, C., and Orłowski, M. (1997). Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by LMP7, LMP2, and MECL1 and changes in properties and specificity. *J Biol Chem* 272, 11824-11831.

Falkenburg, P.E., and Kloetzel, P.M. (1989). Identification and characterization of three different subpopulations of the *Drosophila* multicatalytic proteinase (proteasome). *J Biol Chem* 264, 6660-6666.

Ferrington, D.A., Husom, A.D., and Thompson, L.V. (2005). Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle. *FASEB J* 19, 644-646.

Floreani, A. (2007). Liver diseases in the elderly: an update. *Dig Dis* 25, 138-143.

Frentzel, S., Kuhn-Hartmann, I., Gernold, M., Gott, P., Seelig, A., and Kloetzel, P.M. (1993). The major-histocompatibility-complex-encoded beta-type proteasome subunits LMP2 and LMP7. Evidence that LMP2 and LMP7 are synthesized as proproteins and that cellular levels of both mRNA and LMP-containing 20S proteasomes are differentially regulated. *Eur J Biochem* 216, 119-126.

Frentzel, S., Pesold-Hurt, B., Seelig, A., and Kloetzel, P.M. (1994). 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes. *J Mol Biol* 236, 975-981.

Fricke, B., Heink, S., Steffen, J., Kloetzel, P.M., and Krüger, E. (2007). The proteasome maturation protein POMP facilitates major steps of 20S proteasome formation at the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* 8, 1170-1175.

Froment, C., Uttenweiler-Joseph, S., Bousquet-Dubouch, M.P., Matondo, M., Borges, J.P., Esmenjaud, C., Lacroix, C., Monsarrat, B., and Burlet-Schiltz, O. (2005). A quantitative proteomic approach using two-dimensional gel electrophoresis and isotope-coded affinity tag labeling for studying human 20S proteasome heterogeneity. *Proteomics* 5, 2351-2363.

Gaczynska, M., Goldberg, A.L., Tanaka, K., Hendil, K.B., and Rock, K.L. (1996). Proteasome subunits X and Y alter peptidase activities in opposite ways to the interferon-gamma-induced subunits LMP2 and LMP7. *J Biol Chem* 271, 17275-17280.

- Gaczynska, M., Rock, K.L., and Goldberg, A.L. (1993). Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 365, 264-267.
- Gaczynska, M., Rock, K.L., Spies, T., and Goldberg, A.L. (1994). Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9213-9217.
- Gavilan, M.P., Pintado, C., Gavilan, E., Garcia-Cuervo, L.M., Castano, A., Rios, R.M., and Ruano, D. (2012). Age-related differences in the dynamics of hippocampal proteasome recovery. *J Neurochem* 123, 635-644.
- Gillardon, F., Kloss, A., Berg, M., Neumann, M., Mechtler, K., Hengerer, B., and Dahlmann, B. (2007). The 20S proteasome isolated from Alzheimer's disease brain shows post-translational modifications but unchanged proteolytic activity. *J Neurochem* 101, 1483-1490.
- Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fu, H., Larsen, C.N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., *et al.* (1999). Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol Biol Rep* 26, 21-28.
- Glynne, R., Powis, S.H., Beck, S., Kelly, A., Kerr, L.A., and Trowsdale, J. (1991). A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 353, 357-360.
- Griffin, T.A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H.J., Kaer, L.V., Monaco, J.J., and Colbert, R.A. (1998). Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J Exp Med* 187, 97-104.
- Groettrup, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Stohwasser, R., and Klotzel, P.M. (1996a). A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur J Immunol* 26, 863-869.
- Groettrup, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T.P., Schild, H., Rammensee, H.G., Koszinowski, U.H., and Klotzel, P.M. (1996b). A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature* 381, 166-168.
- Groettrup, M., Standera, S., Stohwasser, R., and Klotzel, P.M. (1997). The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8970-8975.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., and Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 7, 1062-1067.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463-471.

- Groll, M., and Huber, R. (2003). Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 606-616.
- Groll, M., Nazif, T., Huber, R., and Boggyo, M. (2002). Probing structural determinants distal to the site of hydrolysis that control substrate specificity of the 20S proteasome. *Chem Biol* 9, 655-662.
- Guillaume, B., Chapiro, J., Stroobant, V., Colau, D., Van Holle, B., Parvizi, G., Bousquet-Dubouch, M.P., Theate, I., Parmentier, N., and Van den Eynde, B.J. (2010). Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18599-18604.
- Hamilton, A.L., Eder, J.P., Pavlick, A.C., Clark, J.W., Liebes, L., Garcia-Carbonero, R., Chachoua, A., Ryan, D.P., Soma, V., Farrell, K., *et al.* (2005). Proteasome inhibition with bortezomib (PS-341): a phase I study with pharmacodynamic end points using a day 1 and day 4 schedule in a 14-day cycle. *J Clin Oncol* 23, 6107-6116.
- Hanada, K., Yewdell, J.W., and Yang, J.C. (2004). Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature* 427, 252-256.
- Harris, J.L., Alper, P.B., Li, J., Rechsteiner, M., and Backes, B.J. (2001). Substrate specificity of the human proteasome. *Chem Biol* 8, 1131-1141.
- Hayashi, T., and Goto, S. (1998). Age-related changes in the 20S and 26S proteasome activities in the liver of male F344 rats. *Mech Ageing Dev* 102, 55-66.
- Heink, S., Ludwig, D., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. (2005). IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9241-9246.
- Hendil, K.B., Khan, S., and Tanaka, K. (1998). Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *Biochem J* 332 (Pt 3), 749-754.
- Hendil, K.B., Kristensen, P., and Uerkevitz, W. (1995). Human proteasomes analysed with monoclonal antibodies. *Biochem J* 305 (Pt 1), 245-252.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
- Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2006). Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Mol Cell* 24, 977-984.
- Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2005). A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* 437, 1381-1385.
- Hirano, Y., Kaneko, T., Okamoto, K., Bai, M., Yashiroda, H., Furuyama, K., Kato, K., Tanaka, K., and Murata, S. (2008). Dissecting beta-ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *Embo J* 27, 2204-2213.

- Hori, H., Nemba, T., Miyata, Y., Hayashi, T., Ueno, K., and Koide, T. (1999). Isolation and characterization of two 20S proteasomes from the endoplasmic reticulum of rat liver microsomes. *J Biochem* 126, 722-730.
- Huber, E.M., Basler, M., Schwab, R., Heinemeyer, W., Kirk, C.J., Groettrup, M., and Groll, M. (2012). Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell* 148, 727-738.
- Husom, A.D., Peters, E.A., Kolling, E.A., Fugere, N.A., Thompson, L.V., and Ferrington, D.A. (2004). Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle. *Arch Biochem Biophys* 421, 67-76.
- Joeris, T., Schmidt, N., Ermert, D., Krienke, P., Visekruna, A., Kuckelkorn, U., Kaufmann, S.H., and Steinhoff, U. (2012). The proteasome system in infection: impact of beta5 and LMP7 on composition, maturation and quantity of active proteasome complexes. *PLoS One* 7, e39827.
- Johnston, J.A., Ward, C.L., and Kopito, R.R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 143, 1883-1898.
- Kelly, A., Powis, S.H., Glynn, R., Radley, E., Beck, S., and Trowsdale, J. (1991). Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* 353, 667-668.
- Khan, S., van den Broek, M., Schwarz, K., de Giuli, R., Diener, P.A., and Groettrup, M. (2001). Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver. *J Immunol* 167, 6859-6868.
- Kil, D.Y., Vester Boler, B.M., Apanavicius, C.J., Schook, L.B., and Swanson, K.S. (2010). Age and diet affect gene expression profiles in canine liver tissue. *PLoS One* 5, e13319.
- Kingsbury, D.J., Griffin, T.A., and Colbert, R.A. (2000). Novel propeptide function in 20 S proteasome assembly influences beta subunit composition. *J Biol Chem* 275, 24156-24162.
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Castillo, V., and Goldberg, A.L. (1999). Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol Cell* 4, 395-402.
- Kisselev, A.F., Callard, A., and Goldberg, A.L. (2006). Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem* 281, 8582-8590.
- Klare, N., Seeger, M., Janek, K., Jungblut, P.R., and Dahlmann, B. (2007). Intermediate-type 20 S proteasomes in HeLa cells: "asymmetric" subunit composition, diversity and adaptation. *J Mol Biol* 373, 1-10.
- Kloetzel, P.M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 179-187.

- Kloetzel, P.M. (2004). Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* 5, 661-669.
- Kloetzel, P.M., and Ossendorp, F. (2004). Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 16, 76-81.
- Kloetzel, P.M., Soza, A., and Stohwasser, R. (1999). The role of the proteasome system and the proteasome activator PA28 complex in the cellular immune response. *Biol Chem* 380, 293-297.
- Kloss, A., Meiners, S., Ludwig, A., and Dahlmann, B. (2009). Multiple cardiac proteasome subtypes differ in their susceptibility to proteasome inhibitors. *Cardiovasc Res* 85, 367-375.
- Knolle, P.A., and Gerken, G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 174, 21-34.
- Krüger, E., and Kloetzel, P.M. (2012). Immunoproteasomes at the interface of innate and adaptive immune responses: two faces of one enzyme. *Curr Opin Immunol* 24, 77-83.
- Krüger, E., Kuckelkorn, U., Sijts, A., and Kloetzel, P.M. (2003). The components of the proteasome system and their role in MHC class I antigen processing. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 148, 81-104.
- Kuckelkorn, U., Frentzel, S., Kraft, R., Kostka, S., Groettrup, M., and Kloetzel, P.M. (1995). Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma. *Eur J Immunol* 25, 2605-2611.
- Kuehn, L., and Dahlmann, B. (1996). Reconstitution of proteasome activator PA28 from isolated subunits: optimal activity is associated with an alpha,beta-heteromultimer. *FEBS Lett* 394, 183-186.
- Kwekel, J.C., Desai, V.G., Moland, C.L., Branham, W.S., and Fuscoe, J.C. (2010). Age and sex dependent changes in liver gene expression during the life cycle of the rat. *BMC Genomics* 11, 675.
- Lander, G.C., Estrin, E., Matyskiela, M.E., Bashore, C., Nogales, E., and Martin, A. (2012). Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* 482, 186-191.
- Le Couteur, D.G., Cogger, V.C., Markus, A.M., Harvey, P.J., Yin, Z.L., Ansselin, A.D., and McLean, A.J. (2001). Pseudocapillarization and associated energy limitation in the aged rat liver. *Hepatology* 33, 537-543.
- Le Couteur, D.G., and McLean, A.J. (1998). The aging liver. Drug clearance and an oxygen diffusion barrier hypothesis. *Clin Pharmacokinet* 34, 359-373.
- Le Couteur, D.G., Warren, A., Cogger, V.C., Smedsrod, B., Sorensen, K.K., De Cabo, R., Fraser, R., and McCuskey, R.S. (2008). Old age and the hepatic sinusoid. *Anat Rec (Hoboken)* 291, 672-683.

- Le Tallec, B., Barrault, M.B., Courbeyrette, R., Guerois, R., Marsolier-Kergoat, M.C., and Peyroche, A. (2007). 20S proteasome assembly is orchestrated by two distinct pairs of chaperones in yeast and in mammals. *Mol Cell* 27, 660-674.
- Lee, D.H., and Goldberg, A.L. (1996). Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271, 27280-27284.
- Li, N., Lerea, K.M., and Etlinger, J.D. (1996). Phosphorylation of the proteasome activator PA28 is required for proteasome activation. *Biochem Biophys Res Commun* 225, 855-860.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., and Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268, 533-539.
- Ma, C.P., Slaughter, C.A., and DeMartino, G.N. (1992). Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). *J Biol Chem* 267, 10515-10523.
- Mason, G.G., Hendil, K.B., and Rivett, A.J. (1996). Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. Identification of two phosphorylated subunits and the effect of phosphorylation on activity. *Eur J Biochem* 238, 453-462.
- McCuskey, R.S. (2000). Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver* 20, 3-7.
- McLean, A.J., Cogger, V.C., Chong, G.C., Warren, A., Markus, A.M., Dahlstrom, J.E., and Le Couteur, D.G. (2003). Age-related pseudocapillarization of the human liver. *J Pathol* 200, 112-117.
- Merforth, S., Kuehn, L., Osmer, A., and Dahlmann, B. (2003). Alteration of 20S proteasome-subtypes and proteasome activator PA28 in skeletal muscle of rat after induction of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 740-748.
- Minami, Y., Kawasaki, H., Minami, M., Tanahashi, N., Tanaka, K., and Yahara, I. (2000). A critical role for the proteasome activator PA28 in the Hsp90-dependent protein refolding. *J Biol Chem* 275, 9055-9061.
- Mishto, M., Goede, A., Textoris-Taube, K., Keller, C., Janek, K., Henklein, P., Niewianda, A., Kloss, A., Gohlke, S., Dahlmann, B., *et al.* (2012). Driving forces of proteasome-catalyzed peptide splicing in yeast and humans. *Mol Cell Proteomics*.
- Mittenberg, A.G., Moiseeva, T.N., and Barlev, N.A. (2008). Role of proteasomes in transcription and their regulation by covalent modifications. *Front Biosci* 13, 7184-7192.
- Morel, S., Levy, F., Burlet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Kepper, M., Peitrequin, A.L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J.C., Boon, T., *et al.* (2000). Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12, 107-117.

- Nagorsen, D., Servis, C., Levy, N., Provenzano, M., Dudley, M.E., Marincola, F.M., and Levy, F. (2004). Proteasomal cleavage does not determine immunogenicity of gp100-derived peptides gp100 209-217 and gp100 209-217T210M. *Cancer Immunol Immunother* 53, 817-824.
- Noda, C., Tanahashi, N., Shimbara, N., Hendil, K.B., and Tanaka, K. (2000). Tissue distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes, and PA28 in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 277, 348-354.
- Oliva, J., French, S.W., Li, J., and Bardag-Gorce, F. (2012). Proteasome inhibitor treatment reduced fatty acid, triacylglycerol and cholesterol synthesis. *Exp Mol Pathol* 93, 26-34.
- Orino, E., Tanaka, K., Tamura, T., Sone, S., Ogura, T., and Ichihara, A. (1991). ATP-dependent reversible association of proteasomes with multiple protein components to form 26S complexes that degrade ubiquitinated proteins in human HL-60 cells. *FEBS Lett* 284, 206-210.
- Orlowski, M., Cardozo, C., and Michaud, C. (1993). Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* 32, 1563-1572.
- Overath, T., Kuckelkorn, U., Henklein, P., Strehl, B., Bonar, D., Kloss, A., Siele, D., Kloetzel, P.M., and Janek, K. (2012). Mapping of O-GlcNAc sites of 20 S proteasome subunits and Hsp90 by a novel biotin-cystamine tag. *Mol Cell Proteomics* 11, 467-477.
- Palmer, A., Rivett, A.J., Thomson, S., Hendil, K.B., Butcher, G.W., Fuertes, G., and Knecht, E. (1996). Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem J* 316 (Pt 2), 401-407.
- Peters, B., Janek, K., Kuckelkorn, U., and Holzthutter, H.G. (2002). Assessment of proteasomal cleavage probabilities from kinetic analysis of time-dependent product formation. *J Mol Biol* 318, 847-862.
- Raijmakers, R., Berkers, C.R., de Jong, A., Ovaa, H., Heck, A.J., and Mohammed, S. (2008). Automated online sequential isotope labeling for protein quantitation applied to proteasome tissue-specific diversity. *Mol Cell Proteomics* 7, 1755-1762.
- Realini, C., Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K., and Rechsteiner, M. (1994a). Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 269, 20727-20732.
- Realini, C., Rogers, S.W., and Rechsteiner, M. (1994b). KEKE motifs. Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC class I receptors. *FEBS Lett* 348, 109-113.
- Rechsteiner, M., and Hill, C.P. (2005). Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol* 15, 27-33.

- Rivett, A.J. (1985). Purification of a liver alkaline protease which degrades oxidatively modified glutamine synthetase. Characterization as a high molecular weight cysteine proteinase. *J Biol Chem* 260, 12600-12606.
- Rivett, A.J., Palmer, A., and Knecht, E. (1992). Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J Histochem Cytochem* 40, 1165-1172.
- Rock, K.L., and Goldberg, A.L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 17, 739-779.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771.
- Rodriguez, K.A., Gaczynska, M., and Osmulski, P.A. (2010). Molecular mechanisms of proteasome plasticity in aging. *Mech Ageing Dev* 131, 144-155.
- Sanz, N., Diez-Fernandez, C., Alvarez, A., and Cascales, M. (1997). Age-dependent modifications in rat hepatocyte antioxidant defense systems. *J Hepatol* 27, 525-534.
- Sastre, J., Pallardo, F.V., Pla, R., Pellin, A., Juan, G., O'Connor, J.E., Estrela, J.M., Miquel, J., and Vina, J. (1996). Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology* 24, 1199-1205.
- Schmidt, F., Dahlmann, B., Janek, K., Kloss, A., Wacker, M., Ackermann, R., Thiede, B., and Jungblut, P.R. (2006). Comprehensive quantitative proteome analysis of 20S proteasome subtypes from rat liver by isotope coded affinity tag and 2-D gel-based approaches. *Proteomics* 6, 4622-4632.
- Schmidtke, G., Emch, S., Groettrup, M., and Holzthutter, H.G. (2000). Evidence for the existence of a non-catalytic modifier site of peptide hydrolysis by the 20 S proteasome. *J Biol Chem* 275, 22056-22063.
- Schmidtke, G., Kraft, R., Kostka, S., Henklein, P., Frommel, C., Lowe, J., Huber, R., Kloetzel, P.M., and Schmidt, M. (1996). Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *Embo J* 15, 6887-6898.
- Schmucker, D.L. (1990). Hepatocyte fine structure during maturation and senescence. *J Electron Microscop Tech* 14, 106-125.
- Schmucker, D.L. (1998). Aging and the liver: an update. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 53, B315-320.
- Schmucker, D.L. (2005). Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease ? *Exp Gerontol* 40, 650-659.
- Schmucker, D.L., Mooney, J.S., and Jones, A.L. (1978). Stereological analysis of hepatic fine structure in the Fischer 344 rat. Influence of sublobular location and animal age. *J Cell Biol* 78, 319-337.

- Schmucker, D.L., and Sachs, H. (2002). Quantifying dense bodies and lipofuscin during aging: a morphologist's perspective. *Arch Gerontol Geriatr* 34, 249-261.
- Schoeffner, D.J., Warren, D.A., Muralidara, S., Bruckner, J.V., and Simmons, J.E. (1999). Organ weights and fat volume in rats as a function of strain and age. *J Toxicol Environ Health A* 56, 449-462.
- Seelig, A., Boes, B., and Kloetzel, P.M. (1993). Characterization of mouse proteasome subunit MC3 and identification of proteasome subtypes with different cleavage characteristics. Proteasome subunits, proteasome subpopulations. *Enzyme Protein* 47, 330-342.
- Seifert, U., Bialy, L.P., Ebstein, F., Bech-Otschir, D., Voigt, A., Schroter, F., Prozorovski, T., Lange, N., Steffen, J., Rieger, M., *et al.* (2010). Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* 142, 613-624.
- Shibatani, T., Nazir, M., and Ward, W.F. (1996). Alteration of rat liver 20S proteasome activities by age and food restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 51, B316-322.
- Sijts, A.J., Ruppert, T., Rehmann, B., Schmidt, M., Koszinowski, U., and Kloetzel, P.M. (2000a). Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J Exp Med* 191, 503-514.
- Sijts, A.J., Standera, S., Toes, R.E., Ruppert, T., Beekman, N.J., van Veelen, P.A., Ossendorp, F.A., Melief, C.J., and Kloetzel, P.M. (2000b). MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells. *J Immunol* 164, 4500-4506.
- Sijts, A.J., Villanueva, M.S., and Pamer, E.G. (1996). CTL epitope generation is tightly linked to cellular proteolysis of a *Listeria monocytogenes* antigen. *J Immunol* 156, 1497-1503.
- Sijts, E.J., and Kloetzel, P.M. (2011). The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell Mol Life Sci* 68, 1491-1502.
- Song, X., Mott, J.D., von Kampen, J., Pramanik, B., Tanaka, K., Slaughter, C.A., and DeMartino, G.N. (1996). A model for the quaternary structure of the proteasome activator PA28. *J Biol Chem* 271, 26410-26417.
- Strehl, B., Seifert, U., Kruger, E., Heink, S., Kuckelkorn, U., and Kloetzel, P.M. (2005). Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* 207, 19-30.
- Strehl, B., Textoris-Taube, K., Jakel, S., Voigt, A., Henklein, P., Steinhoff, U., Kloetzel, P.M., and Kuckelkorn, U. (2008). Antitopes define preferential proteasomal cleavage site usage. *J Biol Chem* 283, 17891-17897.
- Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K.B., and Tanaka, K. (2000). Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 275, 14336-14345.

- Tanaka, K. (1998). Proteasomes: structure and biology. *J Biochem* 123, 195-204.
- Tanaka, K., Ii, K., Ichihara, A., Waxman, L., and Goldberg, A.L. (1986). A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution. *J Biol Chem* 261, 15197-15203.
- Toes, R.E., Nussbaum, A.K., Degermann, S., Schirle, M., Emmerich, N.P., Kraft, M., Laplace, C., Zwinderman, A., Dick, T.P., Muller, J., *et al.* (2001). Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med* 194, 1-12.
- Uttenweiler-Joseph, S., Claverol, S., Sylvius, L., Bousquet-Dubouch, M.P., Burlet-Schiltz, O., and Monsarrat, B. (2008). Toward a full characterization of the human 20S proteasome subunits and their isoforms by a combination of proteomic approaches. *Methods Mol Biol* 484, 111-130.
- Vasuri, F., Capizzi, E., Bellavista, E., Mishto, M., Santoro, A., Fiorentino, M., Capri, M., Cescon, M., Grazi, G.L., Grigioni, W.F., *et al.* (2010). Studies on immunoproteasome in human liver. Part I: absence in fetuses, presence in normal subjects, and increased levels in chronic active hepatitis and cirrhosis. *Biochem Biophys Res Commun* 397, 301-306.
- Vigneron, N., Stroobant, V., Chapiro, J., Ooms, A., Degiovanni, G., Morel, S., van der Bruggen, P., Boon, T., and Van den Eynde, B.J. (2004). An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. *Science* 304, 587-590.
- Wang, X., Zhao, Z., Luo, Y., Chen, G., and Li, Z. (2011). Gel-based proteomics analysis of the heterogeneity of 20S proteasomes from four human pancreatic cancer cell lines. *Proteomics Clin Appl* 5, 484-492.
- Warren, E.H., Vigneron, N.J., Gavin, M.A., Coulie, P.G., Stroobant, V., Dalet, A., Tykodi, S.S., Xuereb, S.M., Mito, J.K., Riddell, S.R., *et al.* (2006). An antigen produced by splicing of noncontiguous peptides in the reverse order. *Science* 313, 1444-1447.
- Weeke, B. (1973). Rocket Immuno-electrophoresis. *Scand J Immunol* 2, 37-46.
- Whitby, F.G., Masters, E.I., Kramer, L., Knowlton, J.R., Yao, Y., Wang, C.C., and Hill, C.P. (2000). Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* 408, 115-120.
- Wilk, S., and Orłowski, M. (1983). Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J Neurochem* 40, 842-849.
- Witt, E., Zantopf, D., Schmidt, M., Kraft, R., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. (2000). Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. *J Mol Biol* 301, 1-9.
- Wynne, H., Mutch, E., James, O.F., Rawlins, M.D., and Woodhouse, K.W. (1987). The effect of age on mono-oxygenase enzyme kinetics in rat liver microsomes. *Age Ageing* 16, 153-158.

Wynne, H.A., Cope, L.H., Mutch, E., Rawlins, M.D., Woodhouse, K.W., and James, O.F. (1989). The effect of age upon liver volume and apparent liver blood flow in healthy man. *Hepatology* 9, 297-301.

Yoshimura, T., Kameyama, K., Takagi, T., Ikai, A., Tokunaga, F., Koide, T., Tanahashi, N., Tamura, T., Cejka, Z., Baumeister, W., *et al.* (1993). Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver. *J Struct Biol* 111, 200-211.

Yuan, X., Miller, M., and Belote, J.M. (1996). Duplicated proteasome subunit genes in *Drosophila melanogaster* encoding testes-specific isoforms. *Genetics* 144, 147-157.

Zeesh, J., and Platt, D. (1990). [Age related changes in the liver. Consequences for drug therapy]. *Fortschr Med* 108, 651-653.

Zeesh, J., and Platt, D. (2002). The aging liver: structural and functional changes and their consequences for drug treatment in old age. *Gerontology* 48, 121-127.

Zong, C., Gomes, A.V., Drews, O., Li, X., Young, G.W., Berhane, B., Qiao, X., French, S.W., Bardag-Gorce, F., and Ping, P. (2006). Regulation of murine cardiac 20S proteasomes: role of associating partners. *Circ Res* 99, 372-380.

Zong, C., Young, G.W., Wang, Y., Lu, H., Deng, N., Drews, O., and Ping, P. (2008). Two-dimensional electrophoresis-based characterization of post-translational modifications of mammalian 20S proteasome complexes. *Proteomics* 8, 5025-5037.

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional	MALDI	Matrix-unterstützte
A	Absorption		Laserdesorption/Ionisation
AAA ATPase	<i>ATPases associated with various cellular activities</i>	MCMV IE	murines Cytomegalovirus immediate early
Abb.	Abbildung	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
AK	Antikörper		
AMC	7-Amido-4-Methylcoumarin	min	Minute(n)
APS	Ammoniumpersulfat	Mo	Monat
AS	Ammoniumsulfat	PA	Proteasom Aktivator
ATP	Adenosintriphosphat	PAC	<i>proteasome assembly</i>
CTL	cytotoxische T-Lymphocyten	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser		
DMSO	Dimethylsulfoxid	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PEG	Polyethylenglykol
DTT	Dithiotreitol	POMP	<i>proteasome maturation protein</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PVDF	Polyvinylidenfluorid
ER	endoplasmatisches Reticulum	RNA	Ribonukleinsäure
ESI	Elektrospray-Ionisierung	rpm	<i>rotation per minute</i>
FCS	fötales Kälberserum	S	Sedimentationskoeffizient
FPLC	<i>Fast Protein Liquid chromatographie</i>	SD	Standardabweichung
		SDS	Natriumdodecylsulfat
Frag	Fragment	sec	Sekunde
g	Gramm	SEM	<i>standard error of the mean</i>
h	Stunde	Sub	Subpopulation
HIC	hydrophobe Interaktions-Chromatographie	Tab	Tabelle
		TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
HPLC	<i>high pressure liquid</i>		
IFN γ	Interferon γ	TBS	<i>tris buffered saline</i>
l	Liter	TEMED	N,N,N',N', Tetramethyl
LSEC	sinusoidale Leberendothelzelle		ethylendiamin
M	(mol/l)	TFA	Trifluoressigsäure

TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)- Aminomethan
ü.N.	über Nacht
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultra Violett
V	Volumen

Anhang

Zu 3.1.2, Abb. 2 (Overlay Rohextrakte): Quantifizierung des Proteingehaltes auf dem Nativgel:

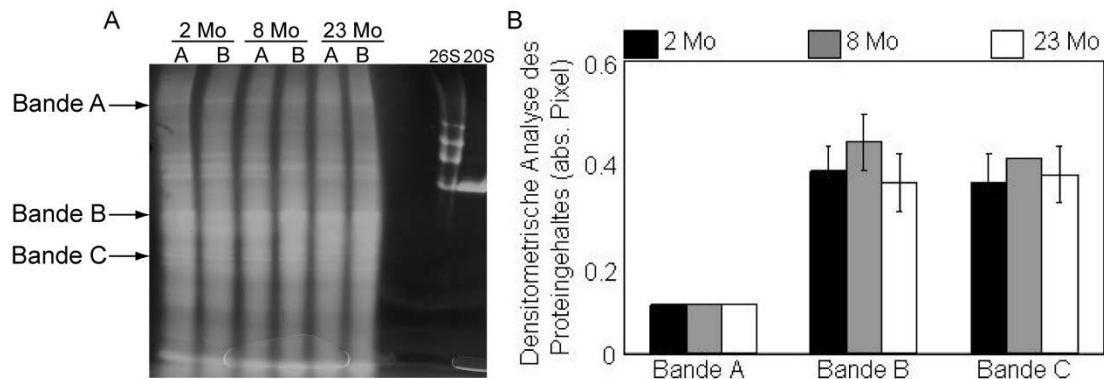


Abb. A1: Coomassiefärbung des Nativgels (A) A und B bezeichnen jeweils zwei untersuchte Tiere jeder Altersstufe. Als Ladekontrolle wurden die mit Bande A, B und C beschrifteten Banden mittels ImageJ densitometrisch analysiert (B). Die gleichmäßige Ladung bezüglich der Proteinmenge konnte gezeigt werden.

Zu 3.1.3, Abb. 3: Bestimmung des Gesamt-20S-Proteasomgehalts in Rohextrakten:

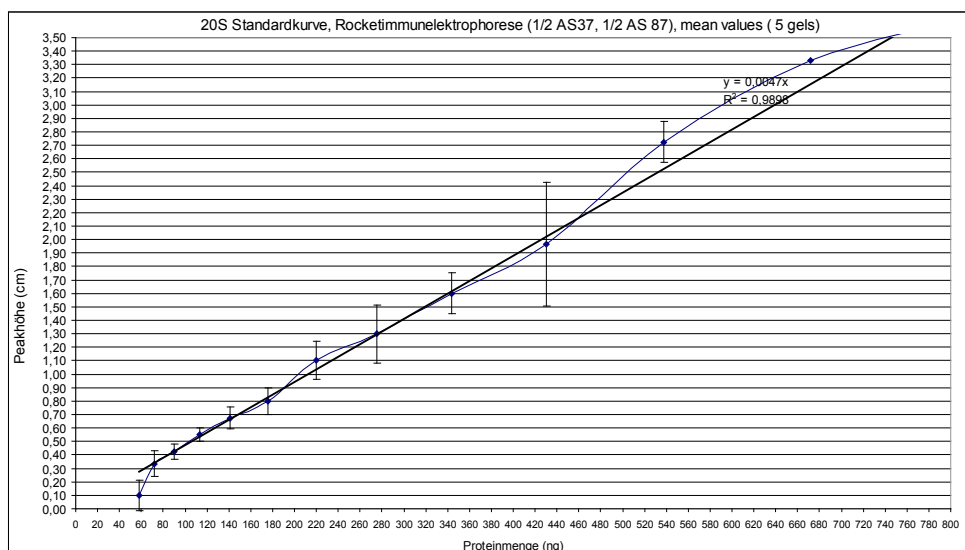


Abb. A2: Standardkurve zur Analyse der 20S Konzentration in Gewebeextrakten. Aufsteigende Proteinmengen von aufgereinigtem 20S Proteasom wurden auf Rocket-Gele aufgetragen (n=5). Die Höhe der Rockets wurde gemessen und die Mittelwerte im Diagramm verzeichnet. Die Standardkurve wurde von C. Baumann erstellt.

Zu 3.2.3, Abb. 11: 2D Blots der 8 Monate alten Tiere: Nachweis von Standard und Immununtereinheiten:

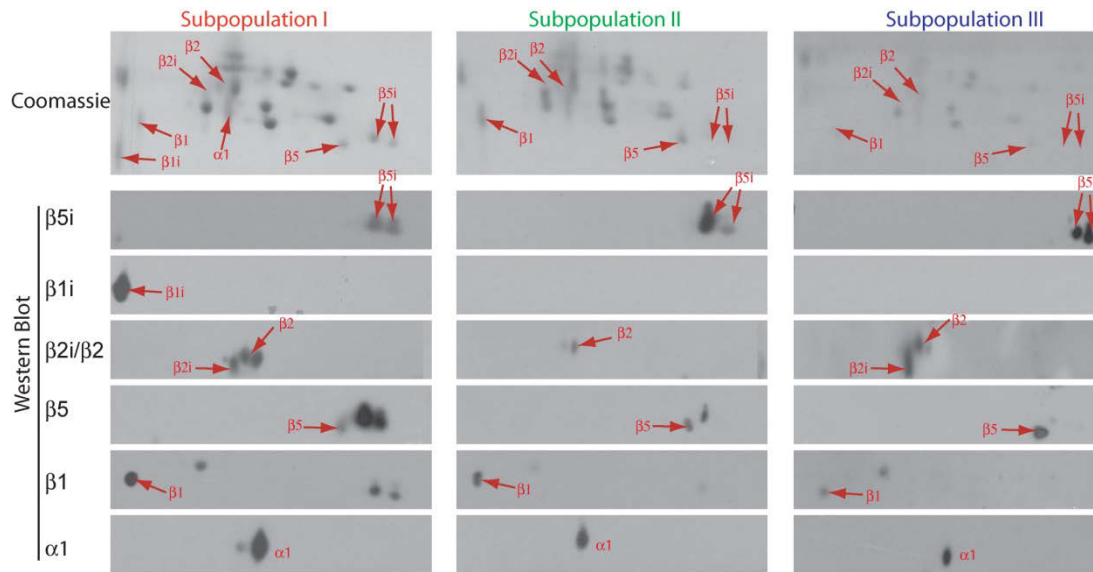


Abb. A3: Immunoblot nach 2D-Page mit 5 μ g der Subpopulationen I-III 8 Mo alter Tiere. Immunoblots der Altersstufen 2 und 23 Mo sind identisch (nicht gezeigt). Standard- und Immununtereinheiten konnten identifiziert werden.

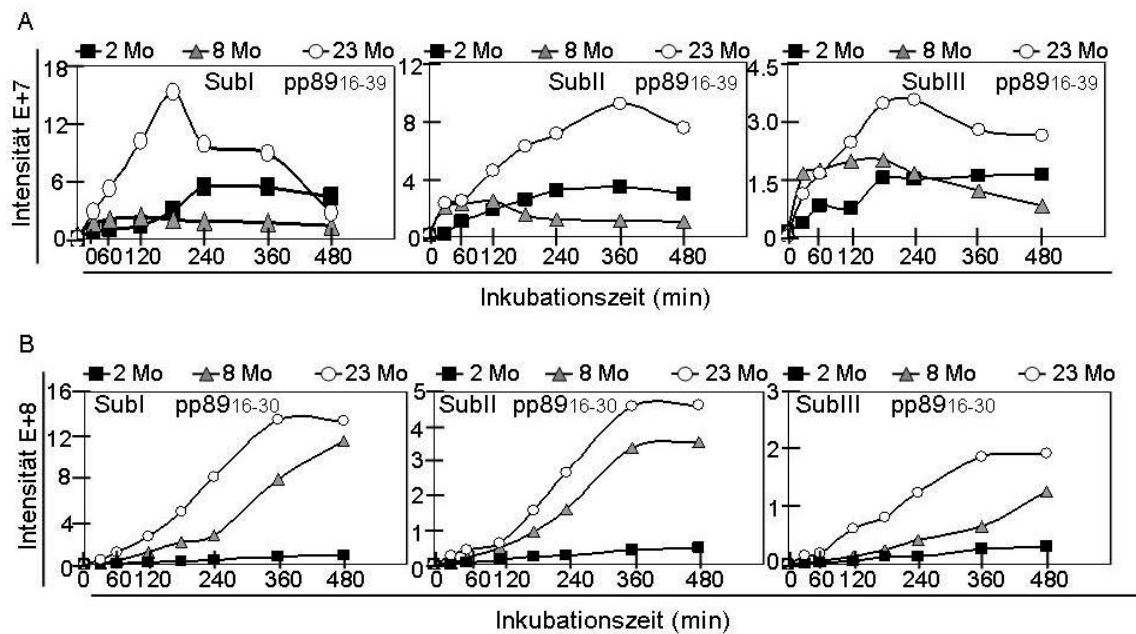
Zu 3.2.4: Fragmentgenerierung beim Abbau von pp89₁₆₋₄₀ durch Subpopulationen

Abb. A4: Bildung des Carboxyterminalen Fragments pp89₁₆₋₃₉ bei Abbau des 25mers pp89₁₆₋₄₀ durch Subpopulationen I-III (A). Die schnelle Bildung des Peptids durch 20S Proteasomen 23 Mo alter Ratten erklärt den schnellen Substratabbau in den ersten 60 min des Verdaus. Pp89₁₆₋₃₉ wird weiter prozessiert. Unter anderem wird das Peptid pp89₁₆₋₃₀ gebildet, dass nach dem carboxyterminalen Fragment sekundär entsteht (B).

Zu 3.3.3: 2D-PAGE der Subtypen I.4 und II.2:

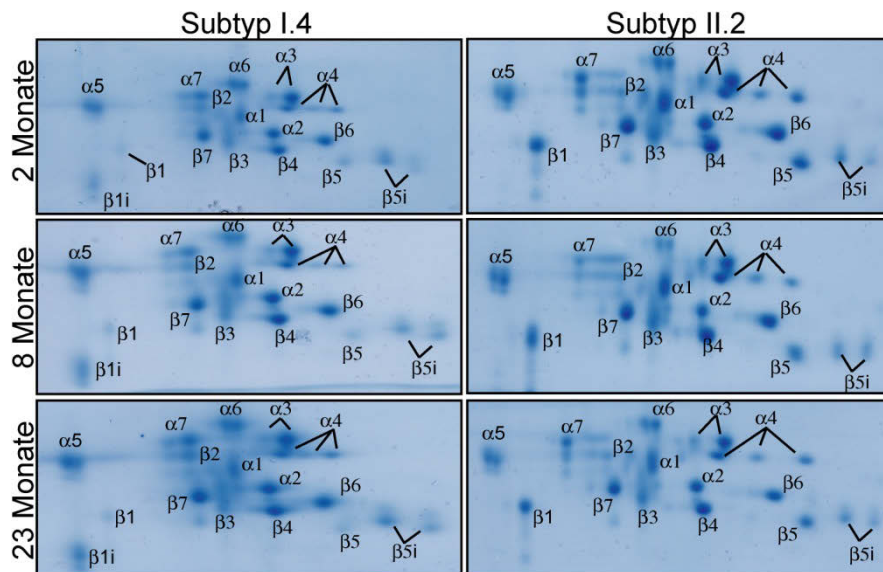


Abb. A5: Vergleich der Subtypen I.4 und II.2 verschiedener Alterstufen mittels 2D. 30 μ g der Subtypen wurden mit Ethanol gefällt und auf die 1. Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetragen. Nach Coomassiefärbung ist das typische 20S Proteasomenmuster zu erkennen. Mit zunehmendem Alter steigt der Gehalt der Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ in Subtyp I.4. In Subtyp II.2 konnte kein $\beta 1i$ detektiert werden. Mittels der Färbung lassen sich jedoch keine Veränderungen für die Untereinheiten $\beta 5i$ in Subtyp II.2, sowie die Standarduntereinheiten $\beta 5$ und $\beta 1$ in beiden Subtypen erkennen.

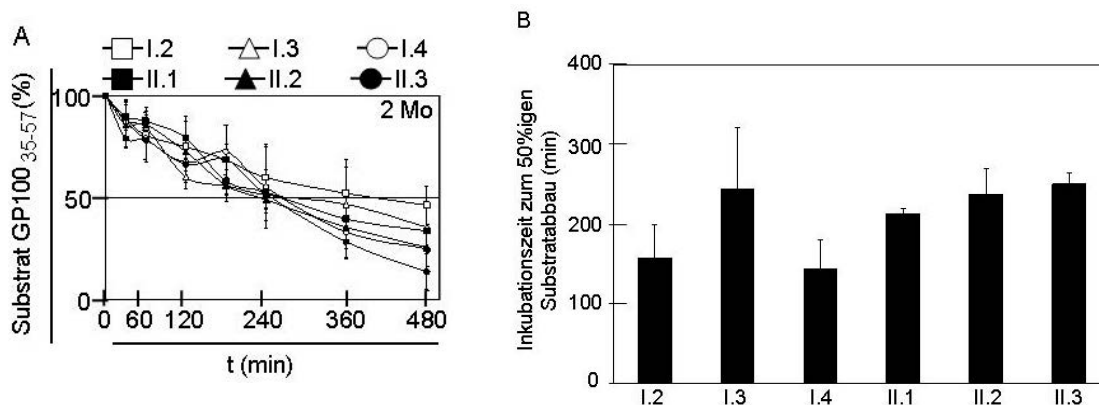
Zu 3.4.1: Abbau des Peptidsubstrates GP100₃₅₋₅₇ durch Subtypen isoliert aus Leber 2 Mo alter Ratten:

Abb. A6: Verdau des Peptidsubstrats GP100₃₅₋₅₇ (je 40 μ M) mit 0,5 μ g 20S Proteasomsubtypen verschiedener Altersstufen bei 37 °C. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Subtypen 2 Mo alter Tiere wurden bei Verdau des 23mers GP100₃₅₋₅₇ detektiert.

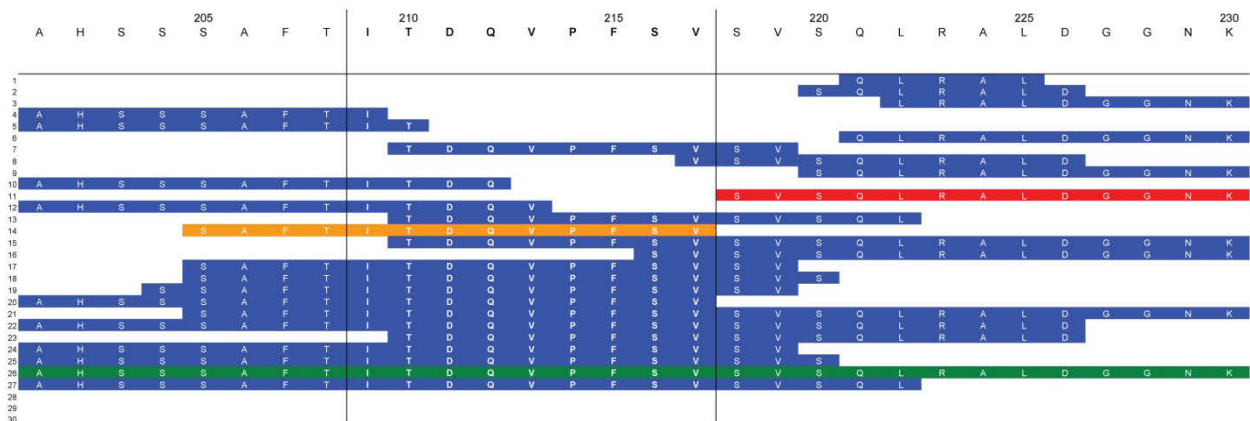
Zu 3.4.2: Ausschnitt aus der Schnittkarte des GP100₂₀₁₋₂₃₀

Abb. A7: Ausschnitt aus der Schnittkarte des GP100₂₀₁₋₂₃₀. Dargestellt sind mittels Massenspektrometrie indentifizierter Peptide, die bei der Hydrolyse des Substrates durch 20S Proteasomen entstehen können. Bei Abbau des GP100₂₀₁₋₂₃₀ wurden bereits 120 Peptide identifiziert.

Zu 3.4.3: Vergleich des zeitabhängigen Substratabbaus durch Subtypen 2, 8 und 23 Mo alter Ratten:

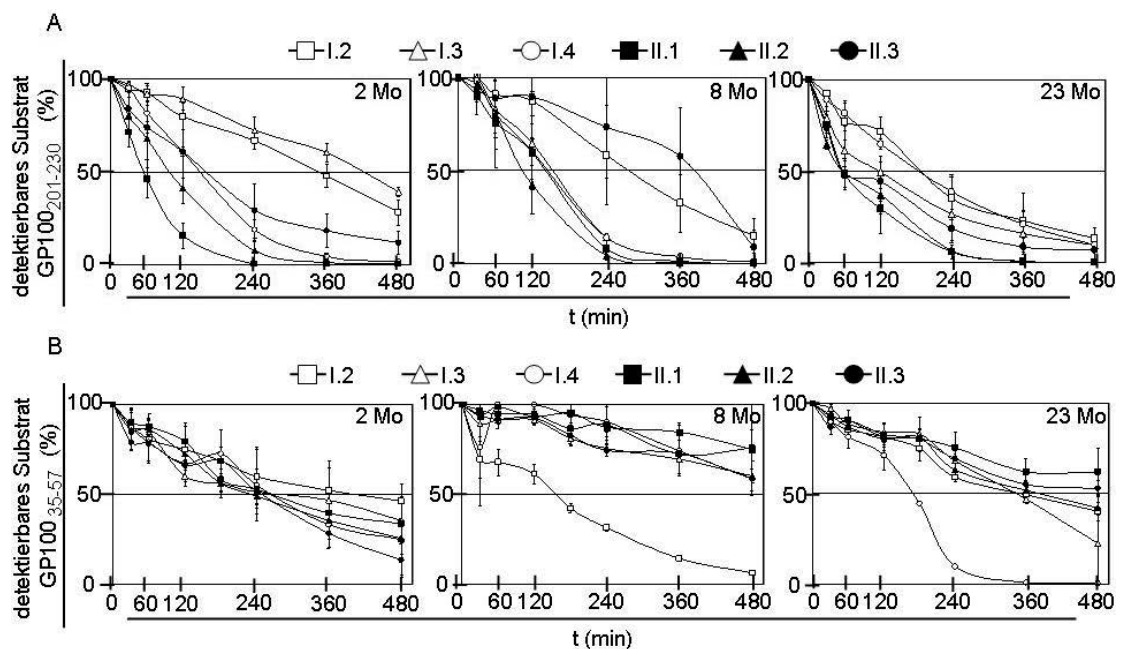


Abb. A8: Verdau der Peptidsubstrate GP100₂₀₁₋₂₃₀ und GP100₃₅₋₅₇ (je 40 μ M) mit 0,5 μ g 20S Proteasomsubtypen verschiedener Altersstufen bei 37 °C. Nach 240 min Inkubation des GP100₂₀₁₋₂₃₀ mit Subtypen mit Ausnahme von I.2 und I.3 2 Monate und I.2 sowie II.3 8 Monate sind über 50% des Substrates abgebaut worden (A). Sehr schnelle Hydrolyse mit Subtypen II.1 und II.2 aller Altersstufen. Signifikante kinetische Unterschiede zwischen den Altersstufen wurden bei Verdau des 23mers GP100₃₅₋₅₇ detektiert, die Subtypen I.3 – II.3 der 8 Monate alten Tiere hydrolysieren dieses Substrat dsignifikant langsamer als Subtypen aus Lebern 2 und 23 Monate alter Tiere (B).

Zu 3.4.4, Abb. 29: Bildungskinetiken der Peptide GP100₄₀₋₄₂ und GP100₄₇₋₅₂ bei Abbau von GP100₄₀₋₅₂ durch Sub I und II \pm PA28:

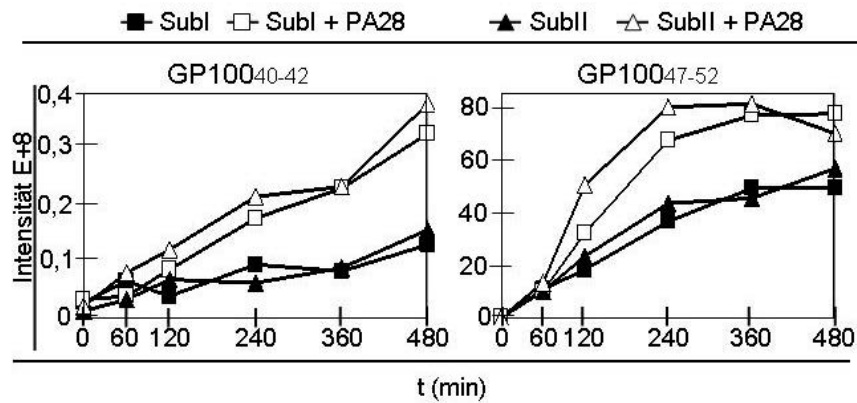


Abb. A9: Bildung der Peptide GP100₄₀₋₄₂ und GP100₄₇₋₅₂ bei Abbau des 13mers GP100₄₀₋₅₂ durch Sub I und II \pm PA28. Entsprechend der erhöhten Abbaurrate werden die untersuchten Peptide durch PA28 ebenfalls schneller gebildet.

Zu 3.5.3: Analyse der Untereinheiten in Subpopulationen aus humaner Leber und HUH7:

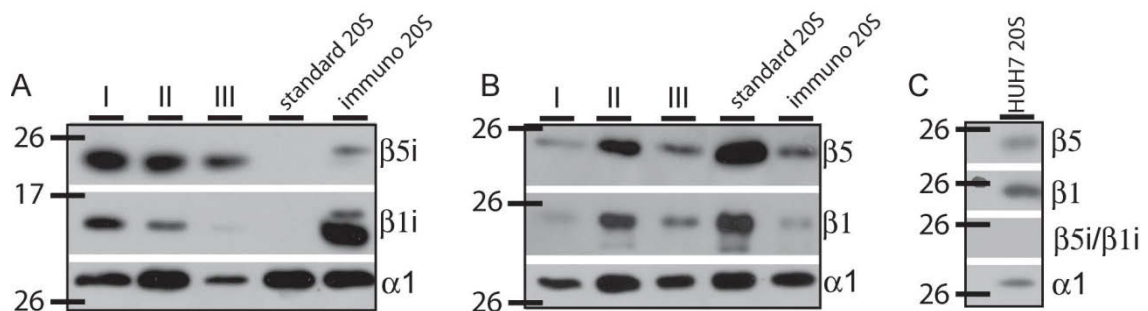


Abb. A10: Je 0,5 μ g der gereinigten 20S Proteasomenpopulationen wurden auf 12,5% SDS-Polyacrylamidgele getrennt und per Western Blot auf PVDF Membranen übertragen. Die proteasomalen Untereinheiten wurden mit den bereits zuvor verwendeten spezifischen Antikörpern gegen $\beta 5i$ und $\beta 1i$ (A), sowie $\beta 5$ und $\beta 1$ (B) detektiert. Die gleiche Untersuchung wurde mit HUH7 20S-Proteasom durchgeführt (C). Zur Ladekontrolle wurde ein monoklonaler $\alpha 1$ Antikörper verwendet. Als Kontrolle wurde gereinigtes Standard-20S-Proteasom aus humanen Erythrocyten sowie gereinigtes Immun-20S-Proteasom aus Human-Milz verwendet.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Kloetzel für die Möglichkeit, die Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Dahlmann, der jederzeit für Diskussionen und Hilfen (und auch für gemeinsame Kaffeepausen) zur Verfügung stand.

Ganz herzlich danke ich der „Sonnenfeldstiftung“, die das letzte Jahr meiner Dissertation finanziert hat.

Ein ganz liebes Dankeschön geht an Alex, Dagmar, Caro und Isa, sowie Thorsten für viel fachliche Hilfe und nette Freizeitgestaltung. Vor allem Dagmar und Alex bin ich dankbar, die sich die Zeit genommen haben mich einzuarbeiten.

Michele schulde ich großen Dank, da ohne ihn die Analyse der Schnitthäufigkeiten nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank geht ausserdem an die „Masse“, vor allem Kathrin und Christin, aber auch Katharina und Agathe, die ganze Arbeitstage mit der Analyse meiner Proben verbracht haben.

Ganz herzlicher Dank gebührt außerdem Prof. Dr. Tsokos für die Hilfe bei der Untersuchung humaner Leber-20S Proteasomen.

Als letztes danke ich der gesamten AG Kloetzel für das angenehme Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft.

Publikationen

[A tandem sequence motif acts as a distance-dependent enhancer in a set of genes involved in translation by binding the proteins NonO and SFPQ.](#)

Roepcke S, Stahlberg S, Klein H, Schulz MH, Theobald L, Gohlke S, Vingron M, Walther DJ.; BMC Genomics. 2011 Dec 20;12:624.

[Driving forces of proteasome-catalyzed peptide splicing in yeast and humans.](#)

Mishto M, Goede A, Textoris-Taube K, Keller C, Janek K, Henklein P, Niewianda A, Kloss A, Gohlke S, Dahlmann B, Enenkel C, Kloetzel PM; Mol Cell Proteomics. 2012 Jul 20.

[Poly-UB-Substrate-Degradative Activity of 26S Proteasome is not impaired in the aging brain](#)

Carolin Giannini, Alexander Kloß, Sabrina Gohlke, Michele Mishto, Thomas P. Nicholson, Paul W. Sheppard, Peter-Michael Kloetzel, Burkhardt Dahlmann; PLoS ONE 8(5): e64042. doi:10.1371/journal.pone.0064042

[Molecular alterations in proteasomes of rat liver during aging result in altered proteolytic activities](#)

Sabrina Gohlke¹, Michele Mishto¹, Katrin Textoris-Taube¹, Christin Keller¹, Carolin Baumann¹, Francesco Vasuri², Elisa Capizzi², Antonia D'Errico-Grigioni², Peter-Michael Kloetzel¹, Burkhardt Dahlmann^{1§}; AGE 2013 May 8. Accepted

Berlin, 06.11.2012

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine unerlaubten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Prüfungsleistung wurde bisher bzw. gleichzeitig keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift